

**(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG**

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. November 2003 (27.11.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/097869 A2

(51) Internationale Patentklassifikation^{7:} C12Q 1/68 **(81) Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE03/01572

(22) Internationales Anmeldedatum:
16. Mai 2003 (16.05.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 22 632.6 17. Mai 2002 (17.05.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): CON / CIPIO GMBH [DE/DE]; KYSELHÄUSER STRASSE 77, 06526 Sangerhausen (DE).

(72) Erfinder: SÜSS, Karl-Heinz (verstorben).

(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



A2

(54) Title: MICROSATELLITE MARKERS FOR GENETIC ANALYSES AND THE DIFFERENTIATION OF ROSES

WO 03/097869

(54) Bezeichnung: MIKROSATELLITENMARKER FÜR GENETISCHE ANALYSEN UND ZUR UNTERSCHIEDUNG VON ROSEN

(57) Abstract: Microsatellites from plants of the rose family, including said isolated microsatellites, primers from flanking regions of the microsatellites, a method for the production of microsatellites and the use thereof in the genotyping of plants from the rose family.

(57) Zusammenfassung: Mikrosatelliten aus Pflanzen der Gattung Rosa, einschließlich den isolierten Mikrosatelliten, Primern aus flankierenden Regionen der Mikrosatelliten, ein Verfahren zur Herstellung der Mikrosatelliten und deren Verwendung zur Genotypisierung von Pflanzen der Gattung Rosa.

Mikrosatellitenmarker für genetische Analysen und zur Unterscheidung von Rosen

Der Erfindung betrifft neuartige genetische Marker für genetische Analysen und zur

5 Unterscheidung von Rosen.

Mögliche Anwendungsgebiete sind marker-gestützte Selektion und Herkunfts- und Variationsanalysen in Pflanzenzüchtung, Gartenbau und Landwirtschaft.

Stand der Technik

10

Rosa ist eine Gattung mit über 20 Arten allein in Deutschland, deren taxonomische Einteilung sich noch weitgehend in der Diskussion befindet (Haeupler H., Muer T., Bildatlas der Farn- und Blütenpflanzen Deutschlands). Die Gattung umfaßt Arten unterschiedlicher Ploidiestufen und unterschiedlichster geographischer Herkunft. Eine
15 Vielzahl von Wildrosenarten kommt auf allen Kontinenten der Nordhalbkugel vor. Zudem sind natürliche Hybriden von im selben Habitat vorkommenden Rosenarten häufig, wodurch die Definition klar differenzierter Arten zusätzlich erschwert wird.

20

Andererseits ist die leichte Kreuzbarkeit von verschiedenen Rosenarten die Grundlage der großen Vielfalt von durch Züchtung entstandenen Sorten. Diese Vielfalt umfaßt Sorten mit unterschiedlicher Blütenfarbe und -form, unterschiedlicher Blühdauer (jährlich nur einmal blühend oder remontierend), Pflanzengröße und Wuchsform (Strauch-, Hecken-, Beet-, Kletter-, Bodendeckerrosen usw.), Art der Belaubung und Bestachelung, Aussehen der Früchte (Hagebutten), Winterhärtete, Krankheitsresistenz
25 und Ansprüchen an die Bodenqualität.

30

Für eine sichere Bestimmung von Arten und Sorten (die meist Ergebnisse komplexer Kreuzungen sind) ist in den meisten Fällen Blüte, Frucht, Bestachelung, Belaubung und Wuchsform mit einzubeziehen. Somit ist im Allgemeinen auch für den Fachmann kurzfristig lediglich eine Zuordnung zu einer Gruppe von Arten und Sorten möglich, nicht aber eine eindeutige Bestimmung.

Aufgabe-Lösungszusammenhang

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, neue Mikrosatellitenmarker zur genetischen Analyse von Pflanzen der Gattung Rosa bereitzustellen.

5

Die Aufgabe der Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert.

Wesen der Erfindung

- 10 Die erfindungsgemäßen Marker basieren auf der Amplifikation bestimmter hypervariable Genomabschnitte, den sogenannten Mikrosatelliten, mit Hilfe der Polymerasenkettreaktion (PCR). Zur spezifischen Amplifikation werden für jeden Mikrosatelliten-Locus zwei Primer, jeweils links und rechts in den flankierenden Sequenzen benötigt. Diese Primer sind im Durchschnitt 23 +/- 5 Basen lang und durch ihre Sequenzen definiert. Ein Mikrosatellitenmarker ist im Prinzip eine sequence tagged site (STS), welche durch zwei spezifische Primer definiert ist. Diese Primer flankieren, jeweils links und rechts eine sogenannte Mikrosatellitensequenz. Eine Mikrosatellitensequenz ist definiert als tandemrepetitive Wiederholung einer Di-, Tri- oder Tetranukleotidsequenz, beispielsweise $(GA)_n$, wobei $n \geq 8$ ist. Es treten auch 15 zusammengesetzte Mikrosatellitensequenzen auf, beispielsweise $(GT)_n(AT)_n$, sowie imperfekte Sequenzen, bei welchen einzelne Basen mutiert sind, beispielsweise $(GT)_nCA(AT)_n$. Zwischen verschiedenen Linien und Sorten kommt es zu Variationen 20 der Anzahl der Repeats an einem bestimmten Locus. Dies führt nach Amplifikation des Mikrosatelliten mittels der spezifischen Primer in den flankierenden Sequenzen zu 25 PCR-Produkten verschiedener Länge und damit zu Polymorphismus. Diese Polymorphismen werden stabil vererbt und können daher als genetische Marker verwendet werden. In manchen Fällen treten auch Nullallele (kein sichtbares Fragment) auf, wenn Mutationen innerhalb der Bindungsstelle für die Primer vorhanden sind.
- 30 Über die biologische Funktion dieser der repetitiven Fraktion des Genoms zugeordneten Motive gibt es bisher keine gesicherten Erkenntnisse. Es wurde jedoch festgestellt, daß die Anzahl der Wiederholungen eines Mikrosatellitenmotivs zwischen nah verwandten Arten, Sorten und Linien variabler ist als der übrige (insbesondere codierende) Teil des

Genoms. So könnten z.B. drei Rosensorten einen Mikrosatelliten tragen, der in der Länge variiert (12, 14 und 17 Wiederholungen des Motivs GT), dessen flankierende Sequenzen aber in allen drei Sorten identisch sind. Somit kann durch PCR relativ leicht ein Längenunterschied nachgewiesen werden: ein Primerpaar bestehend aus je einem 5 Primer links und rechts von der Mikrosatellitensequenz wird zur Amplifikation eines DNA-Fragments aus jeder der drei Linien verwendet.

Diese Fragmente unterscheiden sich dann in ihrer Länge: das Produkt der zweiten Sorte ist um 4 bp grösser als das der ersten Sorte, das Produkt der dritten Sorte um 10 bp. Dieser Längenunterschied (Längenpolymorphismus) kann z.B. durch verschiedene 10 Techniken der hochauflösenden Elektrophorese (z.B. Kapillarelektrophorese) nachgewiesen werden. Damit sind diese drei Rosensorten eindeutig unterscheidbar, und zwar in jeder Entwicklungs- und Verarbeitungsstufe, aus der DNA gewonnen werden kann (Blatt, Blüte, Frucht, Same, Keimling, evtl. auch Rosenöl, Hagebuttenmarmelade, Tee, Trockensträuße usw.).

15 Die Auftrennung und Detektion der erhaltenen PCR-Produkte kann mit verschiedenen technischen Varianten durchgeführt werden. Für die Auftrennung der Fragmente können hochauflösende Agarosegele, native Polyacrylamidgele oder denaturierende Polyacrylamidgele (=Sequenziergele) verwendet werden. Die Auftrennung kann auch 20 auf massenspektrometrischem Wege durchgeführt werden. Die Detektion der Fragmente kann je nach Trennungssystem über Ethidiumbromidfärbung, Silberfärbung oder bei radioaktiver Markierung der PCR-Fragmente über Autoradiographie erfolgen. Eine weitere sehr effektive Variante der Auftrennung und Detektion besteht im Einsatz 25 eines automatischen Sequenziergerätes mit farbstoff- bzw. fluoreszenzmarkierten Primern. Hierzu ist erforderlich, einen Primer aus jedem Mikrosatelliten-Primerpaar farbstoff- bzw. fluoreszenzmarkiert zu synthetisieren. Aus der PCR-Amplifikation resultiert ein markiertes Produkt, welches von dem Sequenziergerät detektiert werden kann. Dabei werden für jede Probe farbstoff- bzw. fluoreszenzmarkierte 30 Größenstandards in derselben Spur mit aufgetrennt. Eine spezielle Software erlaubt es danach, die absolute Größe jedes aufgetrennten Fragmentes zu berechnen und somit auch Fragmente zwischen verschiedenen Gelläufen zu vergleichen. Mit dieser Methode können pro Tag mehrere hundert Proben weitgehend automatisch analysiert werden.

Untersucht man eine größere Zahl von Sorten, so geht diese Eindeutigkeit verloren: Bei 100 Sorten werden mehrere Sorten dieselbe PCR-Produktgröße zeigen und durch einen einzigen Mikrosatellitenmarker nicht voneinander unterscheidbar sein. Deshalb müssen mehrere Mikrosatellitenmarker, die unabhängig voneinander in ihrer Länge variieren, 5 parallel untersucht werden. Daraus ergibt sich für jede untersuchte Rosensorte eine eindeutige Kombination von Mikrosatelliten-Fragmentlängen, die als der „Fingerprint“ dieser Sorte bezeichnet werden kann.

Für Rose wird eine Anzahl von 25 Mikrosatellitenmarkern ausreichen, um über 90% der 10 im Handel befindlichen Sorten voneinander zu unterscheiden. Bei Weizen liegt die Zahl z.B. bei 21 Markern für eine Unterscheidung von 95% aller Sorten. Mit diesem Ansatz nicht unterscheidbar bleiben sogenannte „Sports“, also neue Rosensorten, die durch Spontanmutation aus einer bereits existierenden Sorte hervorgegangen sind und sich in nur einer Eigenschaft (z.B. Blütenfarbe oder Wuchsform) von dieser unterscheiden. Die 15 beiden Genome sind in diesem Fall, abgesehen von der Mutation, identisch und mit dem beschriebenen Markerset wahrscheinlich nicht zu differenzieren.

Erfnungsgemäß werden Mikrosatellitenmarker bereitgestellt, die folgende Primerpaare mit zugeordneten Mikrosatellitensequenzen bzw. eine Anzahl davon 20 enthalten und die Loci verschiedener Chromosomen des Genoms von Pflanzen der Gattung Rosa amplifizieren und daher zur Genmarkierung Verwendung finden.

Name	Motiv	Produkt	Tm	Primer F* 5'->3'		Tm	Primer R 5'->3'
		-gröÙe (bp) in "Licht- blick"					
RMS001	GT&GC	242	57.1	TTCAAAATTGCTGCCCTTAG	44.8	TACCAGTGAGTGAGAAATAGTT	
RMS002	GA	138	36.5	AATAATTTCCTTGGTA	36.6	GATTGGTTCACTATTCA	
RMS003	GA	151	52.9	TGGAAAGGGAAAGCAACA	53.0	AAGGTTAGGCAGAAGTGCACAGACAT	
RMS004	GT&AT	143	55.0	CAGGCCAAGGAAGAGGTAAGTAAA	55.7	CGTATGCCGCGTGTAGGAAGG	
RMS005	GA	143	53.1	CTACCCGGTGAACCAGTGACGA	51.9	ATTTTGCCCTCTCCCTTGT	
RMS006	GT&GA	114	53.0	ACCGGTCTCATCTTCCATTG	52.2	GTAGGTCGGTCCGTGTGTC	
RMS007	GA	171	48.4	TCTTCCGACTCCGACAA	54.8	TATGCCATTCAAGACTCTCCAACAC	
RMS008	GA	176	53.4	TCTCTGCGACAAAACAAACACT	61.9	CCATGAAGGGGGAGAGGGA	
RMS009	CT>	145	47.3	ATTGGCAAAGATTCTCCTAC	46.5	ACTTGGTAATTTCGAGCATAA	
RMS010	GA	105	61.2	GGTTGGGGAAATTGAAGCAGAGA	58.9	TCTTTCTCTACAAACCCCCAACAAAC	
RMS011	GT	190	47.9	TAGAACGACCAATAAAAGAGG	48.0	TAACGAAACATCATCAATAGCA	
RMS012	GT	141	48.8	ATAGAAAAATAGAGGGGTGTG	46.4	GATCGAAAAGTGGTCAAAATA	
RMS013	GA	208	57.8	GCCTTAGCCGGGTTCAA	45.6	GATCAAATACCGAACTAACAAAG	
RMS014	GA	124	56.1	TATTCTTCTTCCCACCGACGAC	56.2	CCTCACTGCCAACCCAACTGT	
RMS015	GA	185	46.5	TAATGTTAGGCAGATATAAAGGAGT	52.1	GCAGGCTGCACAAACAGGAA	
RMS016	GA	121	55.1	GGCCTGGACCTTCTCATTTG	56.9	AACCGCTGGCTTCAATT	
RMS017	AT>	246	46.2	AGGTCCCCGGTATTTCAGG	46.2	AGTGGGTTATGGCTTTT	

RMS018	GT	125	46.4	TTTGGGTTAAGTTT	48.0	TGGCCAATAAGGAAGACA
RMS019	GA	104	57.1	ACCGGTTCCATTACCCCTTCACC	57.1	CGTGGCCATGGATTGGATTAAT
RMS020	GA	239	59.9	AGGGGCCCATGCAAATCAA	47.9	TCCTAACGCAAACATGTAAAT
RMS021	GA	188	50.9	AATCCCTCTTACCCAAAACAC	55.2	CGGGCGAACATGGCTTGTT
RMS022	GA	170	51.3	AAGAAGATAAAATTAGGGAAAAA	52.6	GCGCGAACATATTGATGGT
RMS023	GT	170	42.4	TTGCTATTAACTACAGATGAA	51.3	TAACAAATAAAATGGGGAGTAAT
RMS024	AT>	200	44.0	ACTACTGTAAAATATGAAAATCC	50.5	GTAGTAGGGTTGCAAGAAAATA
RMS025	AT / GT	167	33.4	TAATGTAAGCTAACTAATCT	47.1	TTTAAATTTCGGTGGAGA
RMS026	GT	129	38.8	ATAGATATGTTGGGTCA	39.3	AATGTCAGGTTTGTATG
RMS027	AT>	189	47.7	ACCGTTGTCTTATCAGGA	48.2	ATTGGTGGTGTCTTACATTAC
RMS028	AT>	237	50.0	TAGGCAAGACCATGAACCAG	49.9	TGTGCCTGTTGCTTGTGTA
RMS029	GA	201	56.8	GGATAAAACCAACGGGACAGACTC	58.3	TCCGACACCATCCCCTCTACATAA
RMS030	GA	201	46.2	GATAAATTCAAGGGAGAG	50.9	AAAAGATGAAACGACCAAAATAAT
RMS031	GA	202	40.5	TATATTAAGAACAAAGTGAGAAC	43.1	GTGGCTATCGAAAAACAA
RMS032	AT>	193	40.7	AGAAAACCAACCTTAGCAT	44.1	AACCACCATATTTCAGTCA
RMS033	GA	203	60.0	CAAAGAGATGTCGGAAAAGCAGGAAG	59.9	TGCACACCCAAATTACAAACCCACA
				T		
RMS034	GA	136	55.6	GCTTCTCGGTCTCGTGCTCTC	55.2	CTCCCGCTCAAATCAATAATCTC
RMS035	GA	229	58.3	CCTCCCTGGCAGCCCTTTCATT	56.1	ATCGGCTATCCACATCGTCTACAC
RMS036	GA	235	56.4	CTCGGGCCCAAATAACAAT	55.9	TTGCCCTTACATTTCCTACTCCATA
RMS037	GA	228	59.9	AACCTCGGAGGCCATTCAAC	52.1	AGTTTCCCTGCCAGATAAGC

RMS038	GA	115	50.3	GTGATAAGAGCAAAACAAGATGG	53.8	CTCGGGAAAGCCTCAAAA
RMS039	2xGA	124	52.1	GCTGCCCTCTCCAATCAACAA	52.1	CAGCTCAGCAAAGGGGACTA
RMS040	GT	143	46.6	AACCCAAACTTCCCTAAACT	45.7	TCTGTATCTACTGTGGCTAACCC
RMS041	GA	249	49.2	TTAACCCAAAGCACC AAAAT	48.5	ACCTTCACCGATGTATCACCC
RMS042	AT>	181	55.4	GCATGCCAGGCTCTTCAC	55.5	ATGCCAACGCTCTCAGTCAACC
RMS043	GA	215	52.6	GATCAAAGATGGGTCTCCTCTC	54.6	AGGGGAATCTTTGAAAAGTCGTC
RMS044	AT	204	49.6	ACCGATGGATGGCAAATAAC	49.7	ATACAGGACATAAACGGCTAC
RMS045	AT>&AT	233	40.0	GAAAATAAGGACATCATCTAC	41.4	GGTGCCCTCCATTATTAC
	&GA					
RMS046	AT>	247	45.0	AAAAGGATTGGCTGGATGTG	42.4	TATTCCGGTGGACTCTAT
RMS047	GA	98	51.6	GCTCCCTCAATTCCACTCA	51.7	ACCAACCCAATTCGCTCAT
RMS048	GA&AT	197	41.8	ATAAGTATGAAAAGTAAATGAT	44.0	GTATACTAGAAAAACAAAACCTGGT
RMS049	AT>	178	39.9	AAAAAATACAAACCGAAAAAA	52.6	CCAACCCGTCAAGGCTAAA
RMS050	AT&GA	169	43.1	TAAGCCTAAGAAAAACTCATT	48.6	CAGCCGGTCAAGATTCACTTG
RMS051	GT	215	46.5	AGTAGACTGTCCCTCATTAGC	50.9	ATACCATCAGAGAAGAGACGACAC
RMS052	GA	224	59.8	TTAGCCGTTAATTGAGTCGACAAACCT	57.0	TGATGAAACCAATAGAATGAAAACA
				C	GA	
RMS053	GA	160	56.9	GGCGGTAGCTAGTGACTGGAATCT	55.4	CCCTTACCCCTTGTGTTAC
RMS054	AT&GA	239	48.8	CTGGGAGGGAGAACTCTGTCA	48.7	TAGCTTATTAGTCTGCAATTGATGA
RMS055	GA	192	53.4	TGATCACAAAGAGCTTTCAAGTTAG	53.4	AGTTAGGGCGATGTACAAGAAAAT
RMS056	GA	133	36.7	TGTGTAGATTAGGATTCC	35.2	GATCTAGGATGATTCAATA

RMS057	GAA / GA	174	63.4	CGAGGTGGTAAGGGCGAACAAAG	63.5	CCCATCCAAGCGAGACGACGAC
RMS058	GT	143	50.6	CAACCCCTGAAGCCTGAA	47.4	TTTGTAAACCCATTGTGACCATA
RMS059	AT>	126	42.6	ACAGTCTTATAGTGGCTTC	44.9	TACAGGGTTCTAATTGATACATAC
RMS060	GA	219	41.6	CATTCAATTGACTCTAACAGGA	43.5	TATTCTGGTCTAACGCTATTGTAA
RMS061	GT	211	49.6	ATATCAGCCGTCCTCATCAG	38.9	TTAGAAAATCCCCAACAT
RMS062	GA>	189	50.4	GCGAACGGCATTACTTGT	50.5	GTTGTTCTGGTGGTTTT
RMS063	AAA	90	60.4	CCACCGCCCACAATCACAAATG	59.9	GCTCTGGGAGTGGGAATGGGT
RMS064	GA, GT	227	43.7	TTTGCAAAATATGTGAAGC	50.3	GATTGGTCAACCGATATGTAGAA
RMS065	GA	111	42.2	TATAGCTCGGTAGATTCAA	56.2	CCAGACTGCCCAACTCATA
RMS066	GA	198	48.8	TCCACCCACAGACCACAG	49.5	AAGCTCCCTACGATTCACTC
RMS067	GA	169	50.2	CAATCTGCAATCCGAATCC	47.5	ATGGTGAACACAGAAATACTACA
RMS068	GA	199	52.8	GTGGCGCTTCTGCTCCATT	51.8	CATTITGCTTACGTTTCACTTC
RMS069	GT&GA	232	53.0	TCGGAGATTAAAGAGTGAGGTGAGT	56.9	GTGCCCACTTACCCAAACCATC
RMS070	GA	173	45.2	TGGCTCTCGATAACAAACC	54.0	AATAAGAACCAATACCCGAAAGAG
RMS071	GT	90	44.4	GTTAGCATCTGGCACATTAT	46.3	AGTTCCCTGACCAGCAGAG
RMS072	GA	110	46.3	TTAGCTCAAGAACATCAAAAG	51.9	TCCAAACCGAGCTAAGAAAACCT
RMS073	AT>/GA	156	46.0	AAACCCCTTTATGTAGAAGTAG	45.5	AAAACATGAAATTATAACAATAAGTG
A						
RMS074	AT>	237	51.5	GCTTCTATCCACAGTTCACCTC	51.0	TTCATGTCACCGCTTCTGTAAATAG
RMS075	AT>	237	54.4	GCCCCGTAAAAGCCCCGTAAA	48.3	TTGGTCAACCGATATGTAGAAT
RMS076	GA	180	48.9	TGGATGCAAACACCTACAA	58.1	CGTGGCCGGCATTCGTC

RMS077	GA>	154	60.375	AGGTGAACATGGGCCAACTA	57.436	TCAAAGAACATGGCTACTAAGA
RMS078	GT	112	59.585	CCATTCCA AAGTTGCACGTA	60.049	CTCTACTGCCAAGCAACCACA
RMS079	GA	182	59.502	CCGGTATGGAGAGGAATGAG	59.841	GCAATTATCCTTGACAGAACCC
RMS080	GT	213	59.585	GCCTTCAAAGATGGAAACCT	59.470	TTGGTATCACATTACTCTCATTC
RMS081	GT&GA	164	57.402	TTGACACACACACACAAACAT	59.784	GAATGAGAAACAAGTCCCGTCT
RMS082	2xGA	113	59.469	AACAACACACACGGGAATATG	59.873	TGCAGTTGGAGTTGGAGTTG
RMS083	GT	90	60.837	GACGTCCGCACTTAGCAAC	61.720	AGGTCTCAGCATAGACGGC
RMS084	GT	185	59.893	GGGAGTCTCAAGAGCTACCGT	58.787	CTTCATGTAAGGCCACTGGACA
RMS085	GA	204	59.923	ATGCCCATGACTATCTGCC	61.110	TCCAAGATGAAGAACATTGCGG
RMS086	GA	150	60.195	TTCTGTTCATCTGGCCTCC	59.700	GTTCGTAGATTCAGGTGGCC
RMS087	GA	229	60.328	GCCCCAACTATTCCCTCCACT	60.454	CCCACAGTTGTCCAACACAA
RMS088	GA	207	59.955	TCCTGATTGTTATCATCCACTG	59.817	GAAGGGCTCAAGGTTCTCT
RMS089	AT>	161	59.107	TTCTTATTGTTGGTTGGAAAGAAA	59.394	TCAATAGTGAGGGTGGAGGA
RMS090	GT&GC	204	59.837	TGTGTGTATCCATGGCCT	60.080	ATCTGCAATGACAATGGCAA
RMS091	GA>	207	59.513	GATCAGGGTGAATACCGAGC	59.589	GCCACTCTCTGTCTCAA
RMS092	AT>	208	59.546	TGAAATGAGAGACCAATTCCAA	58.762	ATCAAGTGAGGCCGATGGAG
RMS093	GA	116	60.301	CGTTCTCGTTGTGCATCG	60.540	CCCTCTCTCCAGTCACGA
RMS094	GA	175	59.918	TCCTATCCACACCGACATCA	60.125	TCACAAATACTTCCACTCGC
RMS095	GA	163	59.649	CCAATCTCCTCAACTCCCCAG	59.730	TCAGGGCTTCTAAAGCTTGC
RMS096	AT>&AT	203	59.485	TGACCAATATGACAGAGAACCAA	58.143	TGATAGCCTAACATATGGAAACATT
RMS097	GA>	163	60.162	ATCTGGCTGAACACACACA	60.132	CATGCTAACTCTCCATGTTCCA

RMS098	GT / GA	172	59.790	CACGTCCCATTCCAGAAATT	59.943	CCCTCAATGGAGAGCAAGAG
RMS099	GA	166	60.088	GGTCTGGTTCCCTTGAGGTGA	60.096	CTCTCTCGTCGCCAAAGCATIC
RMS100	GT&AT	169	59.556	AGAGCTCCGCTCTGGATATG	59.911	AAGCCAAAGCTTACGTGCAT
RMS101	GA	133	59.291	GAAGAGAAGCTGAAAGCTTGAAAGGA	60.388	CTCCCTCCACTCCCTCACCA
RMS102	GT	170	59.891	AACTAAATGGTTGAGATGCCAAA	59.642	GGAATTTCGTTCCCTTAAGCTAAC
RMS103	GT	193	59.960	ATTATGCGAACCAAACGAGG	60.214	TGGCAGGCATTCTCCCTAAC
RMS104	GA	209	57.011	CTAAAGCTTGAGCAAAACAATG	59.955	GGAGTATTGGCCGTAGGTGA
RMS105	GT&AT	189	58.857	TTGGTCTAATGCCCTATCCC	60.053	CCAGGCCTAGCCATAATTGA
RMS106	GA	189	58.100	CTCTCCCTCTCTGCATCAA	59.982	CCTCTCTCTGCAACCCAAG
RMS107	AT>	194	60.073	CGACCTTGAACCTGGATGGAT	59.266	CATGAAAGTGGAGCTAGCTAACAA
RMS108	GA	183	61.395	GATCGCCATGGCATGTAAAG	59.592	TTCTCTAGTTCCGGCTGC
RMS109	GT	115	59.625	TGCAAACCTAAATTCCACAGAA	60.012	TGGCCTCTACAGCTCCCTGTT
RMS110	GT	194	59.673	TATGAGAAATGAGCGTGTGGG	60.532	TTCCCTCTCATTCCTCTCCCC
RMS111	GA	135	57.738	TTAGTCATCATCTTCAGTTATCAAGA	59.933	ATTCAAATGGCTTCACTGGG
				A		
RMS112	AT>	227	59.294	CAAGGATACCAAGTCGGAGAGA	59.813	AGAAATGGACACAGCTCCGAAA
RMS113	GA	174	60.263	CATGGATTGGTGTCTCTG	59.955	GGCATCAGAAAGCTGAAAGG
RMS114	GA	224	60.134	AGTCGCATAACAGGACTGGG	59.894	TTGGGATTTGGATAAGTCG
RMS115	GA	222	60.027	CGTGAAGAACGCAAAGTCAA	60.059	GGAGGAGAAGGAGGATTGTG
RMS116	AT>	228	59.989	CACCCACTGGAAATACTGGCT	58.724	CGACAAGCATGACCTGAAT
RMS117	GA	199	59.950	TCTTCCTCTCACCGCCAT	60.074	GGCGGATTGGTGAACCTAGA

RMS118	(AT&)GT	168	59.075	TGGCTATGGGAAGAACATGA	59.545	TCAGACAAATAATGCGTTACCAA
RMS119	AT>	122	59.857	GCACGGCACACATATAACAAACAA	59.807	GATATCCGCAGCCAAGAAAG
RMS120	GT	193	57.360	CAGTTGAAGAGAACCAAGGG	60.162	TGGGGGTAGGGAAATGAAA
RMS121	GT	94	60.001	TCCTCTCCAAGACACAATTCTAA	60.999	GCCCTCTCTGCTCTCCCTAA
RMS122	GA	229	60.822	ATTCCACTTCCCTCCCA	59.874	GGATTCCTCCTGCCCTGACCC
RMS123	GA	167	59.128	AAACACACTTAAGGAGGTATTCCCTAA	59.137	CGAAGTCTCCCATGGTTCT
RMS124	GT	107	57.353	TTTGTGGTCGTTGTTGTTGTT	58.149	AGGCACAAATACTATCCACCTG
RMS125	GA	160	60.589	AAGTGAAGACTGAGGCCACCG	59.694	CTACTCCAATGTCGCCCTCC
RMS126	GT	210	59.822	AACGACCCGCCTAGGAGAAA	58.048	TTGTTCTGTCGAATGGGT
RMS127	GA	220	59.967	TGCCCTTTCTAGATTGCTGGAA	60.812	TAGTGTGTCGTCACCCACCC
RMS128	GA	230	60.016	AGCATCAGGACACATTTCAG	60.470	GCGAAGATTCCACCAATGAC
RMS129	GT	229	59.203	ACGTGCACACACTCACACAC	57.100	ACTGATGCAGTTGCTCTGA
RMS130	GA	126	59.518	CAAATCAATCTGCACAAACCA	59.833	TTTGCGAATACCCAGATGCAG
RMS131	GA	230	60.615	CGGCCAGAGATAACAGATGG	58.938	TGTTGTGCTTAACTAACAAACCTT
RMS132	GA	184	59.454	TGTGGTTATGAAATTGCTGGTG	59.956	TTCAGTTGGTTGAATGGGAG
RMS133	GA	124	59.731	TCTGCAACAAATCAGCAGAAGA	59.901	ATTCTGGCAAATCCGAATG
RMS134	GA	226	58.173	TGAGGCTCAAGCAATATGCAA	58.817	GGCTGTCTGATTCCAGTATG
RMS135	GA	190	60.011	GACCGATTGGAGGAAATGA	58.909	TTGCCCTCTCCCTCTGT
RMS136	GA	114	57.218	GATCATGAGAGTCCACCAA	59.939	AAGAGGCAGATAATGGAGCGA
RMS137	GA	228	60.362	TGTACATGATGATGGGACGC	59.847	GGCAAATTGCAAAGACAGTCA
RMS138	GA&dere	157	60.022	CTTCGAGAGGCCACACACCA	60.339	GCAAAACACATCCCACATCATCA

RMS139	GA	187	60.169	CAAGTATCTGCTCAGGCAAGC	60.218	CCATCACATTGGCTCTCT
RMS140	GT	123	59.792	CCAATAGCGATGCAAATGAGA	59.052	TGGCTACCAACTAACCTCCC
RMS141	GT	202	58.624	ACAGAGACTTGACGCTGCAT	59.668	AGCGTGTGTAGCTAGGGAGC
RMS142	2 x GA	186	60.255	TGGCCTCAACGTCTCTACC	58.588	CCTGAAATAATCCCTATGTCAGAAA
RMS143	GA	230	60.261	GTGGGAAGTGTGGGAACAAAC	59.617	GCCTCATCCTGTCCATCTTC
RMS144	GT	202	57.412	TTTATCACTGTCAACAAAGGCCATT	59.661	GAGCTCCATGAGGTGTTCC
RMS145	2 x GA	122	60.397	TGCTCACTTACCCAGAACGCC	59.350	TCTCTCTCATTTCAAGAGTAAACCC
RMS146	GT	186	59.454	ACAAGGCATTTCACCTTGGTT	58.253	TTTCTGGGCCTGCATAAATA
RMS147	AT>	191	59.583	CCAATCTCAATAACACCGAGC	59.767	TCTTTGTGTGCTTAATGCTCA
RMS148	GT	230	59.756	TTAGCAGGCATTGGCACTAT	59.698	ACCTCCAGCACCAACTCCT
RMS149	AT>&AT	203	59.566	CGGTGTGTAGTTGATTGGAA	60.195	TCAAATTCTGGCCTCTGTCC
RMS150	GT	209	60.251	TGCTGCAGTATGATGCCAAT	59.055	TGGAAATCCTTCCCTTCCTT

Erklärung zur obenstehenden Tabelle:

Spalte A: Name	Name des Mikrosatellitenmarkers; RMS für RosenMikroSatellit; fortlaufende Nummern von 001 bis 150
Spalte B: Motiv	Mikrosatellitenmotiv in der DNA-Sequenz, fuer das ein Primerpaar gesetzt wurde
Spalte C: Produktgröße (bp)	anhand der DNA-Sequenz ermittelte theoretische Groesse des PCR-Produkts in der Rosensorte Lichtblick
Spalte D: Tm	theoretische optimale Annealingtemperatur des F-Primers
Spalte E: Primer F* 5'->3'	Sequenz des F-Primers
Spalte F: Tm	theoretische optimale Annealingtemperatur des R-Primers
Spalte G: Primer R 5'->3'	Sequenz des R-Primers

Diese Marker zeichnen sich durch einen hohen Grad an Polymorphismus zwischen verschiedenen Rosensorten bzw. -linien aus und detektieren in der Regel in verschiedenen Rosenlinien mehrere Allele pro genetischem Locus.

Sie sind daher für "DNA fingerprinting", Sortenidentifikation, Verwandschaft- bzw. Ähnlichkeitsstudien und alle Formen von genetischen Kartierungen, einschließlich der Kartierung von Einzelgenen und quantitativen Merkmalen (QTLs) verwendbar. Außerdem ist ihr Einsatz sehr gut für eine Automatisierung geeignet und es ist möglich, die Detektion der Produkte mit nichtradioaktiven Methoden durchzuführen. Mit Hilfe dieser erfindungsgemäßen Marker ist z.B. die Möglichkeit einer Unterscheidung nahezu aller im Handel erhältlichen Rosensorten gegeben.

Damit wird es möglich, Rosensorten und -arten, die sich bereits in der Datenbank befinden, im vegetativen Zustand zu bestimmen. Ein weiterer Vorteil der Erfindung liegt in der Identifikation oder Zuordnung anonymer Rosenherkünfte zu einer Verwandtschaftsgruppe. Ferner wird es möglich, Linien, welche unter verschiedenen Sortennamen gehandelt werden, zu identifizieren. Auch kann die genetische Vielfalt einer Gruppe von Linien festgestellt werden (z.B. die genetische Vielfalt im Zuchtmaterial eines einzelnen Züchters). Es wird auch möglich, die genetische Distanz von Eltern einer geplanten Kreuzung und damit möglicherweise auch die Erfolgssichten der Kreuzung abzuschätzen.

Ausführungsbeispiel

Das folgende Ausführungsbeispiel dient der Erläuterung der Erfindung und schränkt die Erfindung in keinem Falle ein.

Verwendete Methoden

DNA-Isolierung

a. Präparation nach der Methode von Saghai Maroof et al. (1994) Proc. Natl Acad Sci USA 91: 5466-5470:

Etwa 1.5 g Blattmaterial wurden in flüssigen Stickstoff gemörser, mit 15 ml CTAB-Puffer versetzt und 60 min bei 65 inkubiert. Die Mischung wurde zweimal mit Chloroform extrahiert und die DNA mit Ethanol gefällt. DNA-Fäden wurden gefischt, in 70% Ethanol gewaschen und in TE-Puffer aufgenommen. Nach RNase-Verdau wurde mit Phenol und nochmals mit Chloroform extrahiert, mit Ethanol gefällt und wieder in TE gelöst.

b. DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen #69104)

100 mg Blattmaterial wurden in flüssigen Stickstoff gemörser und nach Anleitung des Herstellers verarbeitet.

In beiden Fällen wurde die Konzentration der gewonnenen genomische Rosen-DNA über ein Agarosegel abgeschätzt. Für jede Sorte wurde eine Verdünnung von 2.5 ng/ μ l in Wasser hergestellt. Je 2 μ l dieser Verdünnung wurden in PCR-Platten vorgelegt und eingetrocknet und konnten in diesem Zustand bis zur Verwendung bei Raumtemperatur bis zur Verwendung gelagert werden.

2. PCR-Reaktionen

Die PCR-Reaktionen wurden im 25 μ l-Volumen in einer 96-well-Mikrotiterplatte durchgeführt. Die Reaktion enthielt:

200 nM Primer 1

200 nM Primer 2

je 200 µM dATP, dGTP, dTTP, dCTP

1 x PCR-Puffer (50 mM KCl, 10mM TRIS-HCl (pH 9.0 bei 25°C), 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton® X-100; wird als 10 x Stock zur Polymerase #M2668 mitgeliefert)

ca. 5 ng genomische Rosen-DNA

0.5 U Taq-Polymerase (Promega #M2668)

Die PCR wurde in GeneAmp PCR System 9700 PCR-Maschinen (Applied Biosystems) durchgeführt. Das Temperaturprofil ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

Schritt 1: Initial-Denaturierung	94°C	3 min	
Schritt 2: Denaturierung	94°C	1 min	Schritt 2-4
Schritt 3: Annealing	60°C	1 min	45x
Schritt 4: DNA-Synthese	72°C	2 min	wiederholen
Schritt 5: Final-Synthese	72°C	10 min	
Schritt 6: Kühlung	12°C	6	

3. Fragmentanalyse

Die Größenanalyse der PCR-Produkte wurde auf einem ABI3100-Sequenziergerät durchgeführt. Es wurden Kapillaren einer Länge von 36 cm verwendet, die mit einer aus dem Polymer POP4 (Applied Biosystems) gefüllt waren. Die Laufbedingungen waren: Injektionszeit: 20 ms, Spannung: 15 kV, Laufzeit: 1080 s

Als interne Standardfragmente wurden NED-markierte Fragmente der Länge 73 bp, 121 bp, 156 bp, 235 bp, 303 bp, 377 bp und 434 bp verwendet. Die zu analysierenden PCR-Fragmente trugen für ein später im Hochdurchsatz anzustrebendes Multiplexing eine der drei Markierungsfarben HEX, ROX oder FLU.

Die Analyse der gewonnenen Daten erfolgte über die Programme GeneScan und GenoTyper (Applied Biosystems).

Erstellen einer genomischen Plasmidbibliothek

DNA der Rosensorte „Lichtblick“ wurde aus Laubblättern isoliert. Diese DNA wurde einem Verdau mit dem Restriktionsenzym *Pst*I unterzogen. Über ein präparatives Agarosegel wurde die Fraktion der Restriktionsfragmente von ca. 5 bis 30 kb isoliert

und einem weiteren Restriktionsverdau mit dem Enzym *Mbo*I unterzogen. Über ein zweites präparatives Gel wurden die Fragmente im Bereich von 500-1500 bp isoliert und in den Plasmidvektor pUC18 kloniert. Die so entstandene genomische Plasmidbibliothek von Rose wurde transformiert (*E. coli* XL2-Blue MRF') und auf Petrischalen plattiert.

Entwicklung der Mikrosatelliten

Durch einen Pipettierroboter wurden die Bakterienkolonien als Referenzbibliothek (ein Klon pro Vertiefung) in Mikrotiterplatten überführt. Die Klone wurden dann in hochdichter Anordnung („High-density-array“) auf Nylonmembranen überführt (spotting). Durch radioaktive Hybridisierung mit einem synthetischen Mikrosatelliten-Oligonukleotid (GA_n oder GT_n) wurden die Plasmidklone identifiziert, die einen entsprechenden Mikrosatelliten enthalten. Diese Plasmide wurden für die Sequenzierung im µg-Maßstab präpariert und sequenziert. Durch spezielle Software (Primer 3.0 bzw. DNAStar/PrimerSelect von Lasergene) wurde Primerpaare abgeleitet, die das Mikrosatellitenmotiv einschließen und ein theoretisches Produkt von 80-250 bp erzeugen.

Auswahlkriterien

Durch PCR und Auftrennung der entstandenen PCR-Fragmente über ein ABI3100-Sequenziерgerät von Perkin Elmer wurden Funktionalität (es entsteht ein Fragment im erwarteten Größenbereich) und Spezifität (es entstehen ein oder wenige klar ansprechbare Fragmente) der PCR mit den Primerpaaren überprüft und bei Bedarf optimiert. Zuverlässig funktionierende, polymorphe Mikrosatelliten, die eine klare Differenzierung der 30 für einen Vortest verwendeten Rosensorten erlauben, werden als Markerset für weitere Genotypisierungen ausgewählt. Die Ergebnisse aus der Untersuchung der verschiedenen Sorten werden in einer Datenbank archiviert, die es erlaubt, hinzukommende Sorten als identisch oder nicht identisch mit bereits untersuchten Sorten oder Linien zu identifizieren oder alternativ Verwandtschaft zu den bereits untersuchten Sorten zu bestimmen.

Durchführung der Genotypisierung

Für die weitere Analyse der 84 für die Genotypisierung geeigneten Marker wurden 32 Rosenlinien verwendet (Tabelle 1). Wiederum wurde zunächst DNA präpariert, wobei größere Schwierigkeiten bei der DNA-Präparation aus den im Spätsommer 2001 erhaltenen ausgewachsenen Laubblätter auftraten. Wahrscheinlich werden die Probleme durch lösliche Kohlenhydrate verursacht, die sich in älteren Blättern ansammeln. Das Pflanzenmaterial vom Mai dieses Jahres dagegen ließ sich problemlos verarbeiten. Die Ergebnisse der Fragmentanalysen, die als "Fingerprint" einer Sorte bezeichnet werden können, wurden in einer Datenbank erfasst. Als Beispiel sind die Daten für Mikrosatellitenmarker RMS059 dargestellt (Tabelle 2).

Nach der Genotypisierung, die zweimal an unabhängig präparierter DNA durchgeführt wurde, konnten die analysierten Mikrosatellitenmarker nach ihrer Qualität in zwei Kategorien eingeteilt werden: "brauchbare" und "gute" Marker.

Als Bewertungskriterien wurden folgende Punkte herangezogen:

- wird eine überschaubare Zahl von Fragmenten (Allelen) pro Rosensorte erzeugt (in der Regel 1-4 Fragmente)?
- werden verschiedene Allele etwa gleich stark amplifiziert?
- erschweren Stotterbanden und Schattenpeaks die Auswertung?
- sind die Fragmente in unabhängigen Experimenten reproduzierbar?
- ist die Amplifikation unabhängig von DNA-Qualität und -Menge?
- besteht ein Gleichgewicht zwischen den Allelen, d.h. kommen die verschiedenen Allele im untersuchten Material etwa gleich häufig vor oder gibt es viele nur selten auftretende Allele?

In die Kategorie "gut" fielen 41 (27%) der ursprünglich 150 untersuchten funktionalen Mikrosatellitenmarker und in die Kategorie "brauchbar" 43 Marker (29%). Die anderen 66 Primerkombinationen (44%) waren bereits bei der Testung (siehe oben) als nicht nutzbar bewertet worden. Über 20 dieser für die Genotypisierung nicht nutzbaren Marker können aber für die genetische Kartierung verwendet werden.

Tabelle 1: Liste der untersuchten Rosensorten.

fortlaufende Nummer	Code	Sortenname	Laborkürzel
1	3774	Ulrike	01ULR
2	7062	Sommerliebe	02SOM
3	6982	Spreeglut	03SPR
4	3400	Sappho	04SAP
5	3296	Viridiflora	05VIR
6	5488	Kaiserin Auguste Victoria	06KAI
7	1740	Lady Susan Birch	07LAD
8	4737	Comtesse de Murinais	08COM
9	3963	Zoe	09ZOE
10	4934	Alexandre Dupont	10ALE
11	1431	Ibica	11IBI
12	4437	Dr. Georges Martin	12GEO
13	3960	Zizi	13ZIZ
14	3735	Toni Lander	14TON
15	3162	Signet	15SIG
16	7008	Una	16UNA
17	133	Spes	17SPE
18		Canary Bird	18CAN
19	6120	Mme. Alfred Carriere	19ALF
20	6650	Jan Spek	20.01.02
21	3633	Super Congo	21SUP
22	109	Minette	22MIN
23	2037	Marjorie le Grice	23MAR
24	3969	Pardinas Bonet	24PAR
25	6040	Sangerhausen	25SAN
26	5234	Abraham Zimmermann	26ABR
27		Nida Senf	27NID
28		Lovania	28LOV
29	3346	Autumn	29AUT
30	791	Bertram Park	30BER
31		Lichtblick	31LIC
32		Rosa multiflora thunb. (Japan)	32JAP

Tabelle 2: Datenblatt für Mikrosatellitenmarker RMS059. Spalten bezeichnen verschiedene Allele des Markers in Basenpaaren (bp), Zeilen bezeichnen die 32 verschiedenen Rosensorten; eine 1 steht für Anwesenheit, eine 0 für Abwesenheit eines Allels in der untersuchten Sorte. Die letzte Zeile gibt an, wie oft ein Allel im untersuchten Material beobachtet wurde. Die letzte Spalte enthält die Zahl der Allele in einer Sorte. RMS059 enthält einen Mikrosatelliten mit den dinukleotiden Wiederholungsmotiven AT und GT und zeigt daher Allele mit einem Größenunterschied von 2 bp (mit Ausnahme des größten Allels).

Sorten	121	123	125	127	129	133	137	139	144	
01ULR	1	0	0	1	1	0	0	0	1	4
02SOM	0	1	0	1	1	0	0	0	0	3
03SPR	0	0	0	1	1	0	0	0	1	3
04SAP	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2
05VIR	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
06KAI	0	1	0	1	1	0	0	0	0	3
07LAD	0	1	0	1	1	0	0	0	0	3
08COM	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2
09ZOE	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2
10ALE	1	1	0	0	0	0	0	0	1	3
11IBI	1	1	0	1	1	0	0	0	0	4
12GEO	1	0	0	1	1	0	0	0	1	4
13ZIZ	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2
14TON	1	0	0	1	1	0	0	0	1	4
15SIG	0	0	0	1	1	0	0	0	1	3
16UNA	0	1	1	1	0	0	0	0	0	3
17SPE	0	1	0	1	1	0	0	0	0	3
18CAN	0	0	1	0	1	0	0	1	0	3
19ALF	1	0	0	1	0	0	1	0	0	3
20JAN	1	0	0	1	1	0	0	0	0	3
21SUP	0	0	0	1	1	0	0	0	1	3
22MIN	0	1	0	0	1	1	1	0	0	4
23MAR	1	0	0	1	1	0	0	0	1	4
24PAR	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2
25SAN	1	1	0	0	0	0	0	0	1	3
26ABR	1	0	0	0	1	0	0	0	1	3
27NID	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
28LOV	1	0	0	1	0	0	0	0	1	3
29AUT	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
30BER	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
31LIC	1	0	0	1	1	0	0	0	1	4
32JAP	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	18	13	2	21	18	1	4	1	13	

Ergebnisse der Genotypisierung

Im Vergleich zu anderen Kulturpflanzen wie z.B. Weizen, Raps oder Zuckerrübe zeigt Rose eine hohe durchschnittliche Anzahl von Allelen pro Sorte (letzte Spalte in Tabelle 2), eine hohe Zahl von verschiedenen Allelen pro Mikrosatellitenmarker und relativ wenige Nullallele. Das spiegelt die Heterogenität des untersuchten genetischen Materials und die komplexe Genetik von Rose wider.

Die Ergebnisse der Genotypisierung wurden für eine Verwandtschaftsanalyse der untersuchten Rosensorten über das Programm NTSYS verwendet. Dabei wurden einmal nur die mit den 41 "guten" Markern erzeugten Daten und einmal die mit allen 84 "brauchbaren" Markern erzeugten Daten verrechnet. Die Ergebnisse sind in Form von Stammbäumen in Abbildung 3 und 4 dargestellt. Auf der horizontalen Achse ist jeweils die genetische Distanz angegeben, die zwischen den theoretischen Werten 0 (keine genetische Verwandtschaft) und 1,00 (Übereinstimmung aller untersuchten Markerdaten) liegt. Beide Dendrogramme unterscheiden sich im Wesentlichen nur in der oberen Hälfte, wo Verzweigungen in sehr kurzen Abständen aufeinander folgen. Die Verwandtschaftsbeziehungen in der unteren Hälfte stellen sich bei Verwendung von 41 oder 84 Markern relativ gut übereinstimmend dar.

Das Ziel der Untersuchung, die eindeutige Unterscheidung aller untersuchten Sorten mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern, wurde damit erreicht. Für jede der Sorten existiert nun ein genetischer Fingerabdruck, der mit dem anderer Sorten verglichen werden kann. Je mehr Markerdaten zwischen zwei Sorten übereinstimmen, desto näher sind sie im Dendrogramm benachbart. Die Ergebnisse der durchgeführten Analyse können daher nicht nur zur Unterscheidung von Sorten verwendet werden, sondern auch Verwandtschaften und Züchtungswege offenlegen.

Unter Nutzung der Information, die im Internet zugänglich ist (z.B. www.everyrose.com, www.rogersroses.com), konnte im Dendrogramm von unten nach oben eine grobe Tendenz von Wildarten über alte Sorten zu moderneren Sorten festgestellt werden. Die ganz unten stehende Art *Rosa multiflora* zeigt übereinstimmend in beiden Analysen eine geringe Verwandtschaft von nur 0,22 zu allen anderen untersuchten Sorten.

Auch die Art *Rosa xanthina* mit der Sorte 'Canary Bird' ist kaum mit den übrigen Sorten

verwandt. Die Moosrosen 'Zoé' und 'Comtesse de Murinais' entstanden 1861 bzw. 1843. Die weiter oben stehenden Remontant-Hybriden 'Abraham Zimmermann' (1876) und 'Dr. Georges Martin' (1908) stammen aus der 2. Hälfte des 19. Jahrhunderts bzw. aus dem frühen 20. Jahrhundert. Die relativ junge Teehybriden 'Autumn' (1928), 'Sommerliebe' (1988) und 'Spes' (1970) stehen in der oberen Hälfte des Dendrogramms. Jeweils am oberen Ende sind die beiden Floribundarosen 'Ulrike' (1973) und 'Jan Spek' (1966) zu finden. Schlecht einzuordnen sind die Sorten 'Spreeglut' (Strauchrose, 1985), 'Sangerhausen' (Polyantha-Hybride, 1938) und 'Lichtblick' (Strauchrose, 1972). Sie bilden zwar in beiden Dendrogrammen eine Gruppe, werden jedoch in Abbildung 2 eher in die Verwandtschaft der Teehybriden und in Abbildung 3 eher in die Verwandtschaft der Floribundarosen gestellt.

Definierung eines Sets von 25 Mikrosatellitenmarkern

Für die weitere Genotypisierung einer größeren Zahl von Sorten wurden aus den 41 guten Markern 25 ausgewählt, die verlässliche Ergebnisse liefern, eindeutig unterscheidbare Allele aufweisen und einen hohen Informationsgehalt haben: RMS023, RMS029, RMS038, RMS047, RMS052, RMS057, RMS059, RMS062, RMS065, RMS070, RMS077, RMS088, RMS089, RMS095, RMS097, RMS102, RMS103, RMS104, RMS112, RMS115, RMS120, RMS128, RMS139, RMS146 und RMS148.

Mit Hilfe dieses Sets sollte es möglich sein, mindestens 90% aller Rosensorten zu unterscheiden. Für eine Abstammungsanalyse z.B. zum genauen Nachvollziehen von Züchtungswegen sollte aber eine größere Zahl von Markern eingesetzt werden. Generell steigt die Zuverlässigkeit solcher Analysen proportional mit der Zahl der verwendeten Marker (zumindest im Bereich von unter 100 verwendeten Markern).

Das Ziel der Erfindung, die Entwicklung von mindestens 25 für die Genotypisierung geeigneten Mikrosatellitenmarkern, ist erreicht worden. Insgesamt wurden 84 nutzbare Mikrosatellitenmarker entwickelt, von denen 41 besonders gut einsetzbar sind. Ein Set von 25 Mikrosatellitenmarkern wurde definiert, mit dem eine verlässliche Genotypisierung von weiteren Rosensorten durchgeführt werden kann. Die wichtigsten Angaben und Nutzungshinweise für den Gebrauch der Marker sind in der erstellten Datenbank enthalten.

Nähere Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Die nähere Beschreibung der Mikrosatellitenmarker wird in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5'→3'	Primer 2 (R), 5'→3'	Markie- rung	Tempe- ratur- opti- mum	Anwen- dung	Kommentar	erwart- ete Pro- dukt- größe (bp)	Größen- bereich, untere Grenze	Größen- bereich, obere Grenze	durch- schnitt- liche Allel- anzahl pro Sorte	
RMS001	GT& GC	brauchbar	TTCAAAATTGC TGCCCCCTTAG	TACCAAGTTGAGT GAGAAATAGIT	HEX	55		Geno- typise- rung & Kartie- rung	unterschiedlich starke Allele; unzuverlässige Amplifikation	242	220	250	
RMS002	GA	nicht nutzbar	AATAAATTTCT TTGGTA	GATTGTTTCAC TATTCA	FLU	x	keine	keine Amplifikation	138			4	
RMS003	GA	brauchbar	TGGaaaAGGGAA AAGCAACA	AAGGTAGGCAGA AGTGACAGACAT	ROX	60		Geno- typise- rung & Kartie- rung	Schattenpeaks und echte Peaks v.a. im vorderen Bereich schwer zu unterscheiden; Peaks >170 bp schwach	151	130	190	
RMS004	GT& AT	nicht nutzbar	CAGGCCAAGG AAGAGGTAAAGT AAA	CGTATGCCGTGT TAGGAAGG	FLU	x	keine	unspezifische Amplifikation	143				
RMS005	GA	nicht nutzbar	CTACCCGGTGAC CAGTGACGA	ATTTTGCCTCT CCCTTGT	FLU	x	keine	Keine Amplifikation	143				
RMS006	GT& GA	nicht nutzbar	ACCGGGTCTCAT CTTTCATG	GTAGGTGGTCC GTCTGTCA	FLU	x	keine	Keine Amplifikation	114				
RMS007	GA	nicht nutzbar	TCTTTCGGACT CCGACAA	TATGCCATTGAC ACTCTCCAACAC	ROX	x	keine	Fragmente polymorph, aber z.T. unter 74 bp, deshalb am ABI nicht auswertbar	171	30	180	2	
RMS008	GA	brauchbar	TCTCTGGGACA AAAACAAACAC T	CCATGAAGGGGC GGAGAGGA	ROX	65		Geno- typise- rung & Kartie- rung	Schattenpeaks z.T. schwer von Allelpeaks zu unterscheiden, v.a. im vorderen Bereich; 1 bp- Unterschiede	176	140	200	4
RMS009	CT& GT	nicht nutzbar	ATTGGCAAAAG ATTCTCCCTAC AGA	ACTTGGTAATTTC GAGCATAA	FLU	x	keine	unspezifische Amplifikation	145				
RMS010	GA	nicht nutzbar	GGTTGGGGAA AATTGAAGCAG	TCTTTCCTCTAC AAACCCCAACCA	FLU	x	keine	unspezifische Amplifikation	105				
RMS011	GT	brauchbar	TAGAAACGAC AATAAAAGAGG	TAACGAAACATC ATCAAATAGCA	ROX	55		Geno- typise- rung & Kartie- rung	starker fast monomorpher Peak, daneben seltene Allele, unzuverlässige Amplifikation; 10 bp-Allel sehr schwach	190	170	290	1

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete Produktgröße (bp)	Größen-Bereich, untere Grenze	Größen-bereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
RMS012	GT	nicht nutzbar	ATAGAAAATA GAGGGGGGTG	GATCGAAAAAGTG GTCAAAATA	FLU	60	Kartierung	Neigung zu unspezifischer Amplifikation	141	100	200	4
RMS013	GA	nicht nutzbar	GCCTTAGCCG GGTTTCAA	GATCAATAACCGA ACTAACAAAG	HEX	60	Kartierung	Stotterbanden	208	150	220	1
RMS014	GA	nicht nutzbar	TATTCCTTCCTC CCACCGACGAA C	CCTCACTGCCAA CCCAACGT	FLU	55	keine	nicht reproduzierbarer p/a-Polymorphismus	124	240	300	1
RMS015	GA	brauchbar	TAATGTAGGCA GATATAAAGGA GT	GCAGGCTGCACAA CAAGGAA	ROX	55	Genotypisierung & Kartierung	unterschiedlich starke Allele	185	120	230	3
RMS016	GA	nicht nutzbar	GGCCTGGACC TTTCATTTG	AACCGCTGCTGC TTTCATTTT	FLU	x	keine	unspezifische Amplifikation	121			
RMS017	AT& GT	brauchbar	AGGTCCCGTTA TTTCAGG	AGTTGGCTTATG GCTTTTT	HEX	55	Genotypisierung & Kartierung	"Ige" bei ca. 180 bp, grosse Allele relativ schwach	246	200	270	3
RMS018	GT	nicht nutzbar	TTTGGGGGGG TAAGTTT	TTGGCCAATAAG GAAGACA	FLU	x	keine	keine Amplifikation	125			
RMS019	GA	nicht nutzbar	ACCGTTCCAT TACCCCTTAC	CGTCGGCCATGg ATTGTTGA	FLU	x	keine	keine Amplifikation	104			
RMS020	GA	nicht nutzbar	AGGCGCCAT GCAAAATCAA	TTCCCTAACGCAA ACTATGTAAT	HEX	x	keine	monomorph mit schlecht reproduzierbarer Amplifikation -> evtl. als Sensor für DNA-Menge und -Qualität geeignet	239	220	260	1
RMS021	GA	nicht nutzbar	AATTCCCTCTT ACCAAAAACAC	CGGGCGAAGTCC CCTATG	ROX	x	keine	zu schwache Amplifikation	188			
RMS022	GA	nicht nutzbar	AAGAAGATAAA TTAGGGGGAA AA	GCGCGAACATAAT gATTGGT	ROX	x	keine	keine Amplifikation	170			
RMS023	GT	gut	TTTGCTTATTAAT TACAGATGAA	AAACAAATAAA T	ROX	50	Genotypisierung &		170	140	190	2

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F, 5' -> 3')	Primer 2 (R, 5' -> 3')	Markie- rung	Tempe- ratur- opti- mum	Anwen- dung	Kommentar	erwart- ete Produ- kt- größe (bp)	Größen- bereich, obere Grenze	durch- schnitt- liche Allel- anzahl pro Sorte	
RMS024	AT& GT	brauchbar	ACTACTGtaAA ATATGAAAAAAT CC	GTAGTAGGGTT GCAAGAAAATA	Kartie- rung	Geno- typie- rung & Kartie- rung		Allele verschieden stark: Allele >200 bp meist schwach; nicht gut, aber reproduzierbar	200	170	250	
RMS025	AT / GT	nicht nutzbar	TAATGTAAGCT AACTAATCT	TTTTAAATTTCG GTGGAGAG	ROX	x	keine	keine Amplifikation	167		3	
RMS026	GT	nicht nutzbar	ATAGATATGTT TGGTTCA	AATGTCAGGTTT TGTTATG	FLU	x	keine	schwache und unzuverlässige Amplifikation	129			
RMS027	AT& GT	gut	ACCGTTGTGCT TATCAGGA	ATGGGGTGCT TTTACATTAC	ROX	55		Geno- typie- rung & Kartie- rung	Peaks >160 bp z.T. sehr schwach; Schattenpeaks im vorderen Bereich	189	120	200
RMS028	AT& GT	nicht nutzbar	TAGGCAAGAAC ATggAACAG	TGTGCCTGTTG CTTGTGTA	HEX	x	keine	unspezifische Amplifikation	237			
RMS029	GA	gut	GGATAAAACCA ACGGGACAGA CTC	TCCGACACCATC CCTCCCTACATAA	HEX	65		Geno- typie- rung & Kartie- rung	1 bp-Unterschiede zwischen den Allelen	201	190	230
RMS030	GA	brauchbar	GATAAAATTCA AGGCCGAGAG	AAAAGATGAAGC ACCCAAATAAT	HEX	55		Geno- typie- rung & Kartie- rung	einige Linien mit 7 Peaks, sonst nur 1-2 Peaks	201	150	210
RMS031	GA	nicht nutzbar	TATATTTAAA ACAAGTGAGAA C	GTGGCTATCGAA AAACAA	HEX	x	keine	zu schwache Amplifikation	202			
RMS032	AT& GT	nicht nutzbar	AGAAACCAAC TTAGCAT	AACCATCCATATT TCAGTCA	ROX	x	keine	zu schwache Amplifikation	193			
RMS033	GA	nicht nutzbar	CAAGAGATGTC GGAAAAGCagg AAGT	TGCACACCCAAA TTTACAAACCA A	HEX	60		Stotterbanden, Allele nicht eindeutig ansprechbar	203	160	240	
RMS034	GA	brauchbar	GCTTCTCGGTG CT	CTCCCCGCTCAA AA	FLU	60		Stotterbanden	136	110	190	

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markie- rung	Tempe- ratur- opti- mum	Anwen- dung	Kommentar	erwart- ete Produ- kt- größe (bp)	Größen- bereich, untere Grenze	Größen- bereich, obere Grenze	durch- schnitt- liche Allel- anzahl pro Sorte
			TCGTGCTCTC	TCAAATAAATCTC			typische- rung & Kartie- rung					
RMS035	GA	brauchbar	CCTCCCTGGCA	ATCGGCTATCCA	HEX	55	Geno- typische- rung & Kartie- rung	Stotterbanden	229	180	250	4
RMS036	GA	nicht nutzbar	CTCGGGGCC	TTGCCCTTAGATT	HEX	x	keine	zu schwache Amplifikation	235			
RMS037	GA	gut	AACCTCGGAGC	AGTTTTCCCTGC	HEX	60	Geno- typische- rung & Kartie- rung	unterschiedlich starke Allele	228	180	240	4
RMS038	GA	gut	GTGATAAGAGC	CTCGGGAAAGCC	FLU	55	Geno- typische- rung & Kartie- rung	Allele >150 bp stottern und sind relativ schwach	115	100	180	3
RMS039	2xG A	brauchbar	GCTGCTTCTC	CAGCTCAGCAA	FLU	60	Geno- typische- rung & Kartie- rung	Stotterbanden, 1 bp- Unterschiede	124	80	150	4
RMS040	GT	nicht nutzbar	AACCCCCAAACT	TCTGTATCTACT	FLU	55	Kartie- rung	zu starkes Stottern	143	130	160	2
RMS041	GA	nicht nutzbar	TTAACCCAAAG	ACCTTACCGAT	HEX	55	keine	zu unspezifische Stotterpeaks	249			
RMS042	AT& GT	brauchbar	GCATGGCCAG	ATGCCAAACGTC	ROX	60	Geno- typische- rung & Kartie- rung	Neigung zu Unspezifität; nur im Bereich 180 bis 272 bp auswerten (evtl. nur <200 bp)	181	170	300	3
RMS043	GA	brauchbar	GATCAAAGATG	AGGGGAATCTT	HEX	60	Geno- typische- rung & Kartie- rung	Stotterbanden	215	200	240	3

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markie- rung	Tempe- ratur- opti- mum	Anwen- dung	Kommentar	erwart- ete Pro- dukt- größe (bp)	Größen- bereich, obere Grenze	durch- schnitt- liche Allel- anzahl pro Sorte
			GTTCTCTCT C	GAAAGTCGTT C							
RMS044	AT	brauchbar	ACCGATGGATG GCATAAAC	ATACAGGACATA AACGGCTACC	HEX	55	typise- rung & Kartie- rung	Geno- typise- rung & Kartie- rung	schlechte Reproduzierbarkeit; Amplifikation evtl. stark abhängig von DNA-Menge oder -Qualität	204	190
RMS045	AT& GT& AT& GA	brauchbar	GAaaaTAAGGA CATCATCTAC	GGTCCTCCATT ATTTAC	HEX	55	Geno- typise- rung & Kartie- rung	Stotterbanden, dadurch sind Heterozygote mit 2 bp- Unterschieden schwer auszuwerten; zusätzliche schwache Allele	233	150	240
RMS046	AT& GT	brauchbar	AAAGGATTGCT GGATGTG	TATTGGCTGGAA CTCTAT	HEX	55	Geno- typise- rung & Kartie- rung	pIA-Polymorphismus des 248 bp-Allels (genomspezifischer Marker?); empfindlich für DNA-Kontaminationen	247	200	200
RMS047	GA	gut	GCTCCCTCAAT TTCCACTCA	aCCAACCCAATT CGCTCAT	F1U	60	Geno- typise- rung & Kartie- rung	74 bp-Peak lässt sich nicht immer markieren	98	70	110
RMS048	GA& AT	nicht nutzbar	ATAAGTATGAA AAAGTAAAATG AT	GTATACTAGAAA AACAAAAACTGGT	ROX	x	keine	zu schwache Amplifikation	197		
RMS049	AT& GT	nicht nutzbar	AAAAATACAAAC CGAAAAAA	CCAACCGTCAA GGCTAAA	ROX	x	keine	zu schwache Amplifikation	178		
RMS050	AT& GA	brauchbar	TAAGCCTAAGA AAAACCTCATT	CAGCCGTCAGAT TCACTTG	ROX	50	Geno- typise- rung & Kartie- rung	amplifiziert sehr schwach, zeigt nur pIA- Polymorphismus des 177 bp-Allels mit einer Ausnahme: 21 SUP hat 175 bp-Allel	169	140	250
RMS051	GT	brauchbar	AGTAGACTGTC CTCCATTAGC	ATACCATCAGAG AAGAGACGACAC	HEX	55	Geno- typise- rung &	wenig Polymorphismus, Linien mit Nullallelen zeigen einen nicht immer	215	160	240

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' > 3'	Primer 2 (R), 5' > 3'	Markie- rung	Tempe- ratur- opti- mum	Anver- dung	Kommentar	erwart- ete Produ- kt- größe (bp)	Größen- bereich, untere Grenze	durch- schnitt- liche Allel- anzahl pro Sorte	
RMS052	GA	gut	TTAGGCCGTTAA TTGAGTCGACA ACCTC	TGATGAAACCCAA TAGAAATGAAAAC AGA	HEX	60	Kartie- rung	reproduzierbaren 169 bp- Peak	224	160	250	3
RMS053	GA	nicht nutzbar	GCGGGTAGCT AGTGACTGGAA TCT	CCCTTAACCTAAC CCCTTGTAC	ROX	65	keine	Geno- typie- rung & Kartie- rung	unspezifische Amplifikation	160		
RMS054	AT& GA	brauchbar	CTGGGGAGG AACTCtGTC	TAGCTTATTAGTC TGCATTGATGA	HEX	50	Geno- typie- rung & Kartie- rung	241 bp-Allel schwach, wenn kleineres Allel vorhanden	239	190	250	1
RMS055	GA	brauchbar	TGATCACAAAGA GCTTTCAAGT TTAG	AGTTAGGGCGCAT GTACAAGAAAT	ROX	55	Geno- typie- rung & Kartie- rung	Geno- typie- rung & Kartie- rung	192	180	220	4
RMS056	GA	nicht nutzbar	TGTGTAGATTA GCATTCC	GATCTAGGATGA TTCAAATA	FLU	50	Kartie- rung	Doppel- und Dreifachpeaks nicht auswertbar	133	110	170	3
RMS057	GAA / GA	gut	CGAGGGGGT AAGGGCGAaca AAG	CCCATCCAAAGC GAGACGACGAC	ROX	60	Geno- typie- rung & Kartie- rung	viele 1 bp-Unterschiede, die aber reproduzierbar sind	174	150	200	3
RMS058	GT	gut	CAACCCCTGAA GCCTGAA	TTTGTAAACCCATT TGACCATA	FLU	55	Geno- typie- rung & Kartie- rung	z.T. sehr starke Amplifikation, dadurch auch starke Schattenpeaks; große Allele schwach	143	120	200	3
RMS059	AT& GT	gut	ACAGTCTTATA GTGGCTTCC	TACAGGGTTCTA ATTGATACATAC	FLU	55	Geno- typie- rung & Kartie- rung	Allele >130 sind manchmal relativ schwach	126	110	150	3

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markie- rung	Tempe- ratur- opti- mum	Anwen- dung	Kommentar		erwart- ete Pro- du- kt- größe (bp)	Größen- bereich, untere Grenze	Größen- bereich, obere Grenze	durch- schnitt- liche Allel- anzahl pro Sorte
RMS060	GA	brauchbar	CATTCTATTGA CTCTAAGGA	TATTCGGTCTAA GCTATTGTAA	HEX	50	Geno- typie- rung & Kartie- rung	schwach und unzuverlässig, aber evtl. genomspezifisch	219	205	260	2	
RMS061	GT	brauchbar	ATATCAGCCGT CCCATCGA	TTAGAAAATCCC AAACAT	HEX	50	Geno- typie- rung & Kartie- rung	gut reproduzierbare Nullallele, evtl. genomspezifisch	211	190	240	1	
RMS062	GA& GT	gut	GCGAACGGCA TTTACTTGT	GGTTGGTCTGGG TGGTTTT	ROX	55	Geno- typie- rung & Kartie- rung	1 bp-Unterschiede	189	150	200	4	
RMS063	GAA	gut	CCACCGCCA CAATCACAATG	GCTCTGGGGAGT GGGAATGGT	FLU	60	Geno- typie- rung & Kartie- rung	zwei Allele < 80 bp; Schattenpeaks und Allele im Bereich um 80 bp überlagernd	90	60	100	2	
RMS064	GA, GT	nicht nutzbar	TTTTTGCAATAT GTGAGGC	GATTGGTCAACC GATATGTAGAA	HEX	50	keine	unspezifische Amplifikation	227				
RMS065	GA	gut	TATAGCTGGGT AGATTCAA	CCAGACTGCCCA CAACTCATA	FLU	55	Geno- typie- rung & Kartie- rung	viele 1 bp-Unterschiede, die aber reproduzierbar sind	111	90	150	3	
RMS066	GA	gut	TCCACCCACAG ACCACAG	AAGCTCCCTAG ATTTCACTC	ROX	60	Geno- typie- rung & Kartie- rung	Schattenpeaks und Allele schwer unterscheidbar, 1 bp-Unterschiede	198	170	220	3	
RMS067	GA	nicht nutzbar	CAAATCTGCAAT CCGAATTC	ATGGTAAAAAC AGAAATACTACA	ROX	x	keine	zu schwache Amplifikation	169				
RMS068	GA	nicht nutzbar	GTGGCGCTTCT GCTCCATT	CATTTGTCCTAC GTTTTCACCTC	ROX	x	keine	keine Amplifikation	199				
RMS069	GT& GA	nicht nutzbar	TCGGAGATTAA GAGTGAGGTqa	GTGCCCACTTAC CCAAACCATC	HEX	65	Kartie- rung	starke Stotterbanden; "Igel" bei 235 bp	232	170	250	1	

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete Produktgröße (bp)	Größenbereich, untere Grenze	Größenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allelanzahl pro Sorte	
			GT										
RMS070	GA	gut	TGCCCTCTCGAT ACAAACC	AAATAAGAACCAA TACCCCGAAGAG	ROX	50		Genotypisierung & Kartierung	sehr gute, von der DNA-Qualität relativ unabhängige Amplifikation, keine Ausfälle oder Nullallele, 158 bp- und 177 bp-Allel z.T. unsicher anzusprechen (Vorpeak zu größerem Fragment oder eigenes Allel?)	173	150	200	3
RMS071	GT	brauchbar	GTTAGGCATCTG GCACATTAT	AGTTCCCTTGACC AGCAGAG	FLU	55		Genotypisierung & Kartierung	verschieden starke Allele, Allele nur z.T. reproduzierbar zwischen 55 und 60°C	90	80	150	2
RMS072	GA	gut	TTAGCTCAAGA ATTCATCAAAG	TCCAAACCGAGC TAAGAAAACT	FLU	55		Genotypisierung & Kartierung	bei starker Amplifikation Doppelpeaks (letzter Peak ist der "echte"); schwache Peaks nicht ausgewertet	110	90	120	1
RMS073	AT& GT/ GAA	brauchbar	AAAACCCcttttA TGTAGAAGTAG	AAAAACATGAAT TATAACAATAGT G	ROX	50		Genotypisierung & Kartierung	Nullallele und schwache Amplifikation kaum unterscheidbar	156	150	180	1
RMS074	AT& GT	nicht nutzbar	GCTTCTATCCA CAGTTTCACCT C	TTCATGTCAACG CTTCTGTAAAG	HEX	x	keine	zu schwache Amplifikation	237				
RMS075	AT& GT	nicht nutzbar	GCCCCGTTAAAAG CCCCTAAAC	TTGGGTCAACCGA TATGTAGAAAT	HEX	x	keine	unspezifische Amplifikation	237				
RMS076	GA	nicht nutzbar	TGGATGCAAAC ACCTACAAA	CGTGCGCGGCAT TCGTC	ROX	x	keine	keine Amplifikation	180				
RMS077	GA& GT	gut	AGGTGAACATG GCCAAACTA	TCAAAGAACATG TGCCTACTAAGA	ROX	60		Genotypisierung & Kartierung	kleinere Allele schwächer	154	130	180	1
RMS078	GT	brauchbar	CCATTCCAAG TTGCACGTA	CTCTACTGCCAG CAACCACA	FLU	60		Genotypisierung, evtl. DNA-Amplifikation, evtl. DNA-	unzuverlässige Amplifikation, evtl. DNA-	112	100	140	2

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker- name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (5'), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markie- rung	Tempe- ratur- opti- mum	Anwen- dung	Kommentar	erwart- ete Pro- dukt- größe (bp)	Größen- bereich, obere Grenze	durch- schnit- liche Allel- anzahl pro Sorte
RMS079	GA	brauchbar	CCGGTATGGA GAGGAATGAG	GCAATTATCCTT GACAGAACCC	ROX	60	rung & Kartie- rung	qualitätsabhängig; Nullallele, schwache Allele, Überschneidungen von Vorpeaks und Allelen			
RMS080	GT	brauchbar	GCTTCAAAAGA TGGAAAACCT	TGGTATCACATT TACTCTCATTC	HEX	60	Geno- typie- rung & Kartie- rung	sehr schöne Alleleiter, aber durch Stotterbanden und schwache Peaks schwierige Auswertung	182	160	210
RMS081	GT& GA	nicht nutzbar	TTTGACACACA CACACAAACAT	GAATGAGAAACA AGTCCGTCCT	ROX	60	Geno- typie- rung & Kartie- rung	verschiedene starke Allele	213	180	230
RMS082	2xG A	brauchbar	AACAAACACACG CGGAATATG	TGCAGTTGGAGT TGGAGTTG	FLU	55	Geno- typie- rung & Kartie- rung	Stotterpeaks, verschieden starke Allele	164	110	180
RMS083	GT	nicht nutzbar	GAGGTCCGCCA CTTAGCAAC	AGGTCCTCAGCA TAGACGGC	FLU	x	Geno- typie- rung & Kartie- rung	starke Schattenpeaks	113	90	150
RMS084	GT	gut	GGGAGTCTCAA GAGCTACCGT	CTTCATGTAAGC CACTGACA	ROX	60	Geno- typie- rung & Kartie- rung	unspezifische Amplifikation	90		
RMS085	GA	nicht nutzbar	ATGCCCATGAC TATCTGCC	TCCAAGATGAAG AATTGCCG	HEX	x	Geno- typie- rung & Kartie- rung	nur Fragmente <200 bp auswerten; 181/183 bp- Doppelpeaks schwer zu interpretieren	185	160	210
RMS086	GA	brauchbar	TTCGTTCATC TGGCCTCC	GTTCGTAGATT AGGTGGCC	FLU	55	Geno- typie- rung & Kartie- rung	unspezifische Amplifikation	204		
RMS087	GA	nicht nutzbar	GCCCAACTATT CCTCCCCACT	CCCAACAGTTGTC CAACACAA	HEX	x	Geno- typie- rung & Kartie- rung	zu schwache Amplifikation	229		
RMS088	GA	gut	TCCTGATTGCT	GAAGGGCCTCAAG	HEX	65	Geno- typie- rung & Kartie- rung	gleichmäßig starke	207	180	220

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markie- rung	Tempe- ratur- opti- mum	Anwen- dung	Kommentar	erwart- ete Produ- kt- größe (bp)	Größen- bereich, obere Grenze	durch- schnitt- liche Allel- anzahl pro Sorte
			ATCATCCACTG	GTTCCCTCT			typisie- rung & Kartie- rung	Amplifikation			
RMS089	AT& GT	gut	TTCCTTATTGTTG A	TCAATAGTGAGG TGCAGAGGA	ROX	55	Geno- typise- rung & Kartie- rung	verlässlich amplifizierender Marker mit 1 bp- Polymorphismen; Heterozygote im Bereich 167-168-169 bp schwer anzusprechen	161	150	190
RMS090	GT& GC	gut	TGTGTGTGATC CATGGCCT	ATCTGCAATGAC AATGCCAA	HEX	60	Geno- typise- rung & Kartie- rung	Nullallele, einige schwach amplifizierende Linien	204	150	220
RMS091	GA& GT	brauchbar	gAtcAGGGTgAat ACCGAGC	gCCACTCTTCTCT GTCCCTCAA	HEX	55	Geno- typise- rung & Kartie- rung	Stutterbanden, unterschiedlich starke Allele	207	190	270
RMS092	AT& GT	nicht nutzbar	TGAATGAGAG ACCAATTCCA	ATCAAGTGAGGCC GATGGAG	HEX	x	keine	unspezifische Amplifikation	208		
RMS093	GA	nicht nutzbar	cGTTCTCGTTG TTGtCATCG	CCCTCTCTCTCC AGTCACG	FLU	60	Kartie- rung	unspezifische Amplifikation	116	80	210
RMS094	GA	brauchbar	TCCATATCCACA CCGACATCA	TCACAAATAACCTT CCACTCGC	ROX	60	Geno- typise- rung & Kartie- rung	verschieden starke Doppelpeaks schwer anzusprechen	175	150	190
RMS095	GA	gut	CCAAATCTCCCT AACTCCCCAG	TCAGGGCTTCTA AAGCTTGC	ROX	60	Geno- typise- rung & Kartie- rung	Doppelpeaks (ersten Peak auswerten)	163	130	190
RMS096	AT& GT& AT	nicht nutzbar	TGACCAATATG ACAGAGAACCA A	TGATAGCCTTAC ATATGAAACAT T	HEX	x	keine	keine Amplifikation	203		
RMS097	GA&	gut	ATCTGGCTGAA	CATGCTAACTCT	ROX	65	Geno-	Allele manchmal	163	150	190

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung & Kartierung	Kommentar	erwartete ProduktgröÙe (bp)	GröÙenbereich, untere Grenze	GröÙenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allelanzahl pro Sorte
	GT		CACCAACACA	CCATGTTCCA			typisierung & Kartierung	unterschiedlich stark				
RMS098	GT / GA	gut	CACGTCCCCATT CCAGAAATT	CCCTCAATGGAG AGCAAGAG	ROX	60	Genotypisierung & Kartierung	bis auf wenige Ausnahmen monomorph	172	150	190	1
RMS099	GA	nicht nutzbar	GGTCTGGTTTC TTGAGGTGA	CTCTCTCGTCCG AAAGCATC	ROX	x	keine unspezifische Amplifikation	166				
RMS100	GT& AT	nicht nutzbar	AGAGCTCCGCT CTGGATATG	AAGCCAAAGCTT ACGTGCAT	ROX	x	keine Amplifikation	169				
RMS101	GA	nicht nutzbar	GAagAGACTGA AAGCTTGAAGG A	CTCCTCTCCACT CCTCACCA	FLU	65	Kartierung	unterschiedlich starke Allele. Schattenpeaks nicht auf Allelepeaks zu unterscheiden; reproduzierbar	133	110	160	3
RMS102	GT	gut	AACTAAATGGT TGAGATGCCAA A	GGAATTTCGTTCTTAAGCTAAGT	ROX	55	Genotypisierung & Kartierung	kleine Fragmente (bis 174 bp) oft schwächer	170	160	210	2
RMS103	GT	gut	ATTATGGAAC CAAACGAGG	TGGCAGCATTCT CCCTAAAC	ROX	55	Genotypisierung & Kartierung	1 bp Unterschiede	193	180	220	2
RMS104	GA	gut	CTAAAGCTTGA GCAAACAAATG	GGAGTATTGGCC GTAGGTGA	HEX	60	Genotypisierung & Kartierung	weitere Peaks bei ca. 400 bp	209	160	220	1
RMS105	GT& AT	nicht nutzbar	tgtGCTAATGC CCTATCCC	CCAGCCCTAGCC ATAATTGA	ROX	60	Kartierung	Stutterbanden	189	80	200	3
RMS106	GA	nicht nutzbar	CTCTCCCTCTC TGCAATAAA	CCTCTCTCTGC AACCCOAG	ROX	55	Kartierung	Stutterbanden	189	150	230	3
RMS107	AT&	gut	CGACCTTgAAC	CATGAAAGTGGAA	ROX	60	Geno-	nur zwei Hauptallele, 205	194	170	210	2

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5'→3'	Primer 2 (R), 5'→3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete ProduktgröÙe (bp)	GröÙenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allelanzahl pro Sorte
	GT		TCGATGGAT	GCTAGCTAAGAA				typische Kartierung	bp schwächer als 203 bp		
RMS108	GA	brauchbar	gATGCCCATgg	TTCTTCTAGTTTC CGGCTGCG	ROX	55		Genotypisierung & Kartierung			
RMS109	GT	nicht nutzbar	TGCAAACCTAA	TGGCCTCTACAG CTCCCTGTT	FLU	x		schlechte Reproduzierbarkeit; Auswertung evtl. auf starke Produkte beschränken	183	150	200
RMS110	GT	brauchbar	TATGAGAAATGA	TTCCCTCTCATTC CTCTCCC	ROX	60		Genotypisierung & Kartierung	unspezifische Amplifikation	115	1
RMS111	GA	nicht nutzbar	ttaGTCATCATCT TCAGTTATCAA GAA	ATTCAATTGGCTT CACTGGG	FLU	x		Genotypisierung & Kartierung	schwache 207 und 211 bp-Allele schwer ansprechbar	194	180
RMS112	AT& GT	gut	CAAGGATACCA	AGAAAATGGACAG CTCCGAAA	HEX	60		Genotypisierung & Kartierung	unspezifische Amplifikation	135	180
RMS113	GA	gut	CATGGATTGCG	GGCATCAGAAAG CTGAAAGG	ROX	65		Genotypisierung & Kartierung	z.T. ungleichmäßige und unzuverlässige Amplifikation; kein reproduzierbares Nullallel	227	210
RMS114	GA	nicht nutzbar	AGTCGCATAAC	TTGGGATTTGG ATAAGTCG	HEX	60		Genotypisierung & Kartierung	viele Nullallele, Stutterbanden	174	160
RMS115	GA	gut	CGTGAAGACG CAAAGTCAA	GGAGGAGAAGG AGGATTGTG	HEX	65		Genotypisierung & Kartierung	schwache Amplifikation, Stutterbanden, Nullallele, schlecht reproduzierbar	224	160
RMS116	AT&	brauchbar	cACCCAcTGGAA	CGACAAGCATGA	HEX	60		Genotypisierung & Kartierung	meist nur ein Allel pro Linie, 221 bp-Allel neben 224 bp-Allel schwer anzusprechen, einige Linien mit schwacher Amplifikation	222	200
								viele Nullallele,		228	160
									240	1	

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar		erwartete ProduktgröÙe (bp)	GröÙenbereich, untere Grenze	GröÙenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allelanzahl pro Sorte	
	GT		tACTGGCT	CCTGAAAT			typisierung & Kartierung	Stotterbanden						
RMS117	GA	brauchbar	TCTTCTTCTCT	GGCCGATTGTT GACCTAGA	ROX	60	Genotypisierung & Kartierung	Schattenpeaks, aber klar differenzierte Allele	199	170	230	2		
RMS118	(AT& GT)	brauchbar	TGGCTATGGAA AGAACATGA	TCAGACAAATAA TGC GTTACCAA	ROX	60	Genotypisierung & Kartierung	Schattenpeaks	168	150	210	2		
RMS119	AT& GT	nicht nutzbar	GCACGCCACACA AA	TATATAAACAAAC	GATATCCG CAGC CAAGAAAG	FLU	65	Kartierung	nicht reproduzierbare Peaks; z.T. <74 bp	122	50	130	2	
RMS120	GT	gut	CAGTTGAAGAG AACCAAGGG	TGGTGGTAGG GAAAATGAAA	ROX	55	Genotypisierung & Kartierung	Schattenpeaks bei ca. -13 bp	193	170	210	3		
RMS121	GT	nicht nutzbar	TCCCTCTCCAAG ACACAAATTTC AA	GCCCTCTCTGCT CCTCCCTAA	FLU	55	Kartierung	Stotterbanden	94	70	130	5		
RMS122	GA	brauchbar	ATTCCACCTTCC TCC TTCCCCA	GGATTCTTTCCCT CGTGACCC	HEX	60	Genotypisierung & Kartierung	Schattenpeaks	229	190	250	3		
RMS123	GA	nicht nutzbar	AAACACTCTAA CTA	CGAAGTCTCCCC TGTTTCT	ROX	x	keine	Stotterbanden	167					
RMS124	GT	nicht nutzbar	TTTGTGGTCGTT GTGTGTGTAT	AGGCACAATACT ATCCACCTG	FLU	65	Kartierung	schwache Amplifikation, viele Ausfälle	107	80	270	2		
RMS125	GA	brauchbar	AAGtgAAGACTG AGCGACCG	CTACTCCAAATGT CGGCTCC	ROX	60	Genotypisierung	Schattenpeaks, große Fragmente meist schwach	160	140	190	3		

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' → 3'	Primer 2 (R), 5' → 3'	Markie- rung	Tempe- ratur- opti- mum	Anwen- dung	Kommentar	erwart- ete Pro- dukt- größe (bp)	Größen- bereich, untere Grenze	Größen- bereich, obere Grenze	durch- schnitt- liche Allel- anzahl pro Sorte
RMS126	GT	brauchbar	AACGACCGCCT AGGAGAAA	TGGTTCTGTTGG AATGGGGT	HEX	60	Kartie- rung	p/a-Polymorphismus des 211 bp-Allels (Genomspezifischer Marker?)	210	190	240	1
RMS127	GA	nicht nutzbar	TGCCTTCTAG ATTTGCTGGA	TAGTTGTCGTC ACCCACCC	HEX	60	Kartie- rung	Stotterbanden, zu komplexes Bandenmuster	220	200	260	3
RMS128	GA	gut	AGCATCACGAG CACATTAG	GCGAAGATTCAAC CCAATGAC	HEX	65	Kartie- rung	Geno- typisie- rung & Kartie- rung	230	190	260	3
RMS129	GT	brauchbar	ACGTGCACACA CTCACACAC	ACTGATGCAGTT TGCTCTGA	HEX	60	Kartie- rung	Geno- typisie- rung & Kartie- rung	229	220	270	2
RMS130	GA	nicht nutzbar	CAAATCAATCT GCAAACCCA	TTTGGAAATACC AGATGCAG	FLU	60	Kartie- rung	zu viele Fragmente (v.a. in 04SAP und 18CAN)	126	80	220	5
RMS131	GA	nicht nutzbar	CGGCCAGAGA TAACAGATGG	TGTTGGTGGCTTA ACTACTACAACC	HEX	60	Kartie- rung	Stotterbanden	230	210	310	2
RMS132	GA	brauchbar	TGTGGTTATGAA ATTGCTGGTG	TTCAGTTGGTT GAATGGGAG	ROX	60	Kartie- rung	Geno- typisie- rung & Kartie- rung manchmal Schattenpeaks; große Fragmente meist schwächer	184	160	220	3
RMS133	GA	nicht nutzbar	TCTGCAACAAT CAGCAGAAA	ATTTCTGGAAAA TCCGAATG	FLU	60	Kartie- rung	unspezifische Amplifikation	124	90	140	4
RMS134	GA	nicht nutzbar	TGAGCTAACGC AATATGCAA	GGCTGTCCTGAA TTCCAGTATG	HEX	60	Kartie- rung	z.T. schwache und stotternde Allele	226	150	250	4
RMS135	GA	nicht nutzbar	GACCGATTGGA GAGGAATGA	TTGCCCTTCTCC CTTCTGTT	ROX	55	Kartie- rung	Geno- typisie- rung & Kartie- rung starke Intensitätsunterschiede zwischen den Allelpeaks	190	160	240	3

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker- name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markie- rung	Tempe- ratur- opti- mum	Anwen- dung	Kommentar	erwart- ete Pro- dukt- größe (bp)	Größen- bereich, untere Grenze	Größen- bereich, obere Grenze	durch- schnitt- liche Allel- anzahl pro Sorte
RMS136	GA	nicht nutzbar	GATCATGAGAGT CGCCAAA	AAGAGGCAGATA TGGAGCGA	FLU	55	Kartie- rung	PCR bei 65°C zu unzuverlässig; bei 55°C unspezifisch	114	90	180	4
RMS137	GA	brauchbar	TGTACATGATG ATGGGACGC	GGCAATTGCAA GACAGTC	HEX	55	Geno- typie- rung & Kartie- rung	Stotterbanden & Vorpeaks, meist aber eindeutig auswertbar	228	210	270	3
RMS138	GA& ande- re	gut	CTTCTGAGAGC CACACACCA	GCAAAACACATCC CATCATCA	ROX	60	Geno- typie- rung & Kartie- rung	Schattenpeaks	157	130	180	2
RMS139	GA	gut	CAAGTATCGCT CAGGCAAGC	CCATCACATTG GCTCTCT	ROX	65	Geno- typie- rung & Kartie- rung	Doppelpeaks, 178 bp-Peak erscheint als Dreifach-Peak	187	170	210	2
RMS140	GT	gut	CCAATAGCGAT GCAATGAGA	TTGGCTTACACT AACCTCCCC	FLU	60	Geno- typie- rung & Kartie- rung	starke Vorpeaks, die aber gut identifizierbar sind; bis auf wenige Ausnahmen monomorph	123	50	140	1
RMS141	GT	nicht nutzbar	ACAGAGACTTG ACGCTGCAT	AGCGTGTGTAGC TAGGCAGC	HEX	x	keine	keine Amplifikation	202			
RMS142	2 X GA	nicht nutzbar	TGGCCTCAACG TCTTCTACC	CCTGAAATAATCC CTATGTCAGAAA	ROX	60	Kartie- rung	zu viele Fragmente	186	160	290	8
RMS143	GA	gut	GTGGAAAGTGT GGGAAACAAC	GCCTCATCCCTGT CCATCTTC	HEX	65	Geno- typie- rung & Kartie- rung	schwache Peaks manchmal nicht eindeutig auswertbar	230	220	250	2
RMS144	GT	gut	TTTATCACTGT CACAAGGCATT A	GAGCTCCATGAG GTGTTCC	HEX	60	Geno- typie- rung & Kartie- rung	von schlechter Amplifikation ist das 199 bp-Allel stärker betroffen als das 205 bp-Allel	202	180	210	2
RMS145	2 X	gut	TGCTCACTTAC TCTCTCTCATTT	FLU	65	Geno- typie- rung & Kartie- rung	wenig polymorph, Allele	122	100	140	2	

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markie- rung	Temperatur- optimum	Anwen- dung	Kommentar	erwartete Produc- ktgröÙe (bp)	GröÙen- bereich, untere Grenze	GröÙen- bereich, obere Grenze	durch- schnitt- liche Allel- anzahl pro Sorte
	GA		CCAGAAAGCC	AAGAGTAAACCC			typisie- rung & Kartie- rung	ungleich stark				
RMS146	GT	gut	ACAAGGCATT CACCTGGTT	TTTCTGGCCTG CATAATA	ROX	55	Geno- typisie- rung & Kartie- rung	gut reproduzierbare Peaks, manchmal zusätzliche Stotterbanden im Bereich 160-175 bp, große Allele meist schwächer	186	150	210	3
RMS147	AT& GT	brauchbar	CCAATCTCAAT AACACCGAGC	TCTTGTCGTGC TAATGCTCA	ROX	55	Geno- typisie- rung & Kartie- rung	1 bp-Unterschiede im hinteren Bereich kaum auswertbar, insbesondere bei Heterozygoten	191	140	220	3
RMS148	GT	gut	TTTAGCAGGCA TTGGCACTAT	ACCTCAGCACC AACTCT	HEX	65	Geno- typisie- rung & Kartie- rung	einige schwache Peaks >240 bp nicht ausgewertet	230	210	250	2
RMS149	AT& GT& AT	nicht nutzbar	CGGTGTAGT tGATTGGA	TCAAATTCTGGC CTCTGTC	HEX	x	keine	keine Amplifikation	203			
RMS150	GT	nicht nutzbar	TGCTGCAGTat GatGCCAAT	TGAAAATCCCTT CCTTCCCTT	HEX	x	keine	keine Amplifikation	209			

Legenden zu den Abbildungen:

Abbildung 1 (zweiseitig, a und b): Elektropherogramm der PCR-Produkte der Rosensorten 10 bis 18 mit der Primerkombination RMS059. Peaks bezeichnen Allele, deren Größe automatisch berechnet (untere Zahl unter dem Peak) und einer Allelkategorie zugeordnet wurde (obere Zahl).

Abbildung 2: Verwandtschaftsanalyse der 32 Sorten anhand von 41 Mikrosatellitenmarkern der Kategorie "gut". Je weiter eine Verzweigung zwischen zwei Sorten nach rechts verschoben ist, desto näher sind sie verwandt.

Abbildung 3: Verwandtschaftsanalyse der 32 Sorten anhand von 84 Mikrosatellitenmarkern der Kategorie "gut" und "brauchbar"

Ansprüche

1. Oligonukleotide von Mikrosatellitenmarkern des Rosengenoms gekennzeichnet durch folgende Sequenzen:

Name	RMS Primer F* 5'->3'	RMS Primer R 5'->3'	Motiv
RMS00 1	TTCAAAATTGCTGCCCTTAG	TACCAAGTTGAGTGAGAAATAGTT	GT&G C
RMS00 2	AATAATTTCCTTTGGTA	GATTGTTTCACTATTCA	GA
RMS00 3	TGGGAAAGGGAAAGCAACA	AAGGTAGGCAGAAGTGACAGACA	GA T
RMS00 4	CAGGCCAAGGAAGAGGTAAGTAA	CGTATGCGCGTAGGAAAGG	GT&A T
RMS00 5	A	ATTTCGCCCTCTCCCTTGT	GA
RMS00 6	CTACCGGTGACCAGTGACGA	GTAGGTCGGTCCGTCTGTCA	GT&G A
RMS00 7	TCTTCCGACTCCGACAA	TATGCCATTCAAGACTCTCCAACAC	GA
RMS00 8	TCTCTGCGACAAAAACAAACACT	CCATGAAGCGCGGAGAGGA	GA
RMS00 9	ATTGGCAAAAGATTCTCCTAC	ACTTGGTAATTCGAGCATAA	CT&G T
RMS01 0	GGTTGGGGAAATTGAAGCAGAG A	TCTTTCTTCTACAAACCCCAACCA AC	GA
RMS01 1	TAGAAACGACCAATAAAAGAGG	TAACGAAACATCATCAATAGCA	GT
RMS01 2	ATAGAAAAATAGAGGGGGTGTG	GATCGAAAAGTGGTCAAAATA	GT
RMS01 3	GCCTTAGCCGGGTTCAA	GATCAATACCGAACTAACAAAG	GA
RMS01 4	TATTCTTCTTCCCACCGACGAC	CCTCACTGCCAACCCAACTGT	GA
RMS01 5	TAATGTAGGCAGATATAAAGGAG T	GCAGCTGCACAACAAGGAA	GA
RMS01 6	GGCCTGGACCTTCTCATTG	AACCGCTGCTGCTTCATTTC	GA
RMS01 7	AGGTCCCGTTATTCAGG	AGTTGGCTTATGGCTTTT	AT&G T
RMS01 8	TTTTGGGTGGTAAGTTT	TTGGCCAATAAGGAAGACA	GT
RMS01 9	ACCGTTCCATTACCCTTCACC	CGTCGGCCATGGATTTGTAA	GA
RMS02 0	AGGCGCCCAGCAAAATCAA	TTCCTAACGCAAACATATGTAAAT	GA
RMS02 1	AATTCCCTCTTACCCAAAACAC	CCGGCGAACATCCCCTATG	GA
RMS02 2	AAGAAGATAAATTAGGGGGAAA AA	GCGCGAACATATTGATTGGT	GA
RMS02 3	TTTGCTATTAATTACAGATGAA	TAAACAATATAAATGGGGAGTAA	GT AT

41

RMS02	ACTACTGTAAAATATGAAAAATC 4 C	GTAGTAGCGGTTGCAAGAAAATA	AT&G T
RMS02	TAATGTAAAGCTAACTAATCT 5	TTTTAAATTTCGGTGGAGA	AT / GT
RMS02	ATAGATATGTTGGGTTCA 6	AATGTCAGGTTTGTATG	GT
RMS02	ACCGTTGTGCTTATCAGGA 7	ATTGGTGGTGCTTTACATTAC	AT&G T
RMS02	TAGGCAAGACCATGAACCAG 8	TGTGCCTGTTGCTTGTGTA	AT&G T
RMS02	GGATAAAACCAACGGGACAGACT 9 C	TCCGACACCATCCCTCCTACATAA	GA
RMS03	GATAAAATTCAAGGCGAGAG 0	AAAAGATGAACGACCCAAATAAT	GA
RMS03	TATATTAAAGAACAAAGTGAGAAC 1	GTGGCTATCGAAAAACAA	GA
RMS03	AGAAACCAACCTTAGCAT 2	AACCATCCATATTCAGTCA	AT&G T
RMS03	CAAGAGATGTCGGAAAAGCAGGA 3 AGT	TGCACACCCAAATTACAAACCAC A	GA
RMS03	GCTTCTCGGTCTCGTGCTCTC 4	CTCCCGCTCAAATCAATAATCTC	GA
RMS03	CCTCCTTGGCAGCCTTTCTATT 5	ATCGGCTATCCACATCGTCTACAC	GA
RMS03	CTCGCGGCCAAATAACAAT 6	TTGCCCTTACATTTCTCTACTCCA TA	GA
RMS03	AACCTCGGAGGCCGATTCAC 7	AGTTTCCTCGCCAGATAAGC	GA
RMS03	GTGATAAGAGCAAAACAAGATGG 8	CTCGCGGAAGCCTCAAAA	GA
RMS03	GCTGCTTCTCCAATCAACAA 9	CAGCTCAGCAAAGGGGACTA	2xGA
RMS04	AACCCAAACTCCTAAACT 0	TCTGTATCTACTGTGGCTAAC	GT
RMS04	TTAACCCAAAGCACCAAAAT 1	ACCTTCACCGATGTATCACC	GA
RMS04	GCATGGCCAGGCTTTCAC 2	ATGCCAACGTCTCAGTCAACC	AT&G T
RMS04	GATCAAAGATGGGTTCTCCTCTC 3	AGGGGAATCTTGAAAGTCGTT	GA
RMS04	ACCGATGGATGGCAATAAC 4	ATACAGGACATAACGGCTACC	AT
RMS04	GAAAATAAGGACATCATCTAC 5	GGTGCCTCCATTATTTAC	AT&G T&AT &GA
RMS04	AAAGGATTGCTGGATGTG 6	TATTCGCGTGGACTCTAT	AT&G T
RMS04	GCTCCCTCAATTCCACTCA 7	ACCAACCCAATTGCTCAT	GA
RMS04	ATAAGTATGAAAAAGTAAAATGA 8 T	GTATACTAGAAAAACAAAACGGT	GA&A T
RMS04	AAAAATAACAACCGAAAAAA 9	CCAACCCGTCAAGGCTAAA	AT&G T
RMS05	TAAGCCTAAGAAAAACTCATT 0	CAGCCGTCAAGATTCACTTG	AT&G A

42

RMS05	AGTAGACTGTCCTCCATTAGC 1	ATACCATCAGAGAAGAGACGACA C	GT
RMS05	TTAGCCGTTAATTGAGTCGACAA 2 CCTC	TGATGAACCCAATAGAACATGAAA AGA	GA
RMS05	GGCGGTAGCTAGTGACTGGAATC 3 T	CCCTTACCCCTTACCCCTTGTAC GA	GA
RMS05	CTGGGAGGAGAACTCTGTCA 4	TAGCTTATTAGTCTGCATTGATGA A	AT&G A
RMS05	TGATCACAAAGAGCTTTCAAGTT 5 AG	AGTTAGGCGCATGTACAAGAAAAT GA	GA
RMS05	TGTGTAGATTAGCATTCC 6	GATCTAGGATGATTCAATA GA	GA
RMS05	CGAGGTGGGTAAAGGGCGAACAAA 7 G	CCCATCCAAAGCGAGACGACGAC TTTGTAAACCCATTGACCATA	GAA / GA GT
RMS05	CAACCCCTGAAGCCTGAA 8	TACAGGGTTCTAATTGATACATAC TATTCTGGTCTAAGCTATTGTAA	AT&G T GA
RMS05	ACAGTCTTATAGTGGCTTCC 9	TTAGAAAATCCCAAACAT GCTCTGGGAGTGGGAATGGT	GT GA&G T GAA
RMS06	CATTCAATTGACTCTAACAGGA 0	GATTGGTCAACCGATATGTAGAA CCAGACTGCCCAACTCATA	GA, GT GA
RMS06	ATATCAGCCGTCCCATCAG 1	AAGCTCCCTACGATTCACTC ATGGTGAAAAACAGAAATACTACA	GA
RMS06	GCGAACGGCATTACTTGT 2	ATGGTGAAAAACAGAAATACTACA GCTCTGGGAGTGGGAATGGT	GA&G T GAA
RMS06	CCACCGCCCACAATCACAAATG 3	GATTGGTCAACCGATATGTAGAA CCAGACTGCCCAACTCATA	GA, GT GA
RMS06	TTTTGCAATATGTGAAGC 4	AAGCTCCCTACGATTCACTC ATGGTGAAAAACAGAAATACTACA	GA
RMS06	TATAGCTCGGTAGATTCAAA 5	ATGGTGAAAAACAGAAATACTACA GCTCTGGGAGTGGGAATGGT	GA&G T GAA
RMS06	TCCACCCACAGACCACAG 6	GATTGGTCAACCGATATGTAGAA CCAGACTGCCCAACTCATA	GA, GT GA
RMS06	CAATCTGCAATCCGAATCC 7	AAGCTCCCTACGATTCACTC ATGGTGAAAAACAGAAATACTACA	GA
RMS06	GTGCGCTTCTGCTCCATT 8	ATGGTGAAAAACAGAAATACTACA GCTCTGGGAGTGGGAATGGT	GA&G T GAA
RMS06	TCGGAGATTAAGAGTGAGGTGAG 9 T	GATTCCTTGTACGTTTCACCTC GTGCCCACCTACCCAAACCATC	GT&G A GA
RMS07	TGCCTCTCGATACAAACC 0	AATAAGAACCAATACCCGAAGA G	GA
RMS07	GTTAGCATCTGGCACATTAT 1	AGTTCCCTGACCAGCAGAG TCCAAACCGAGCTAAGAAAAT	GT GA
RMS07	TTAGCTCAAGAACATTCAAAAG 2	TCCAAACCGAGCTAAGAAAAT TAAACACATGAAATTATAACAATAG	GA
RMS07	AAACCCCTTTATGTAGAAGTAG 3	TAAACACATGAAATTATAACAATAG TG	AT&G T/GAA
RMS07	GCTTCTATCCACAGTTCACCTC 4	TTCATGTCAACGCTCTGTAATAG TTGGTCAACCGATATGTAGAAT	AT&G T AT&G T
RMS07	GCCCGTAAAAGCCC GTAAA 5	TTGGTCAACCGATATGTAGAAT CGTCGCCGGCATTGTC	AT&G T GA
RMS07	TGGATGCAAACACCTACAAA 6	TCAAAGAACATGGGCCAACTA CTCTACTGCCAGCAACCACA	GA&G T GT
RMS07	AGGTGAACATGGGCCAACTA 7	TCAAAGAACATGGGCCAACTA CTCTACTGCCAGCAACCACA	GA&G T GT
RMS07	CCATTCAAAGTTGCACGTA 8	TCAAAGAACATGGGCCAACTA CTCTACTGCCAGCAACCACA	GA&G T GT

8			
RMS07	CCGGTATGGAGAGGAATGAG	GCAATTATCCTTGACAGAACCC	GA
9			
RMS08	GCTTCAAAGATGGAAACCT	TTGGTATCACATTTACTCTCATTC	GT
0			
RMS08	TTTGACACACACACACACAAACAT	GACTGAGAAACAAGTCCGTCC	GT&G
1			A
RMS08	AACAAACACACCGCGGAATATG	TGCAGTTGGAGTTGGAGTTG	2xGA
2			
RMS08	GACGTCCGCACTTAGCAAC	AGGTCCCTCAGCATAGACGGC	GT
3			
RMS08	GGGAGTCTCAAGAGCTACCGT	CTTCATGTAAGCCACTGGACA	GT
4			
RMS08	ATGCCCATGACTATCTGCC	TCCAAGATGAAGAATTGCGG	GA
5			
RMS08	TTCTGTTCATCTGGCCTCC	GTTCGTAGATTCAAGGTCGGC	GA
6			
RMS08	GCCCAACTATTCCTCCACT	CCCACAGTTGCCAACACAA	GA
7			
RMS08	TCCTGATTGATCATCCACTG	GAAGGCCTCAAGGTTCTCT	GA
8			
RMS08	TTCTTATTGTTGGTTGGAAGAAA	TCAATAGTGAGGTGCGAGGA	AT&G
9			T
RMS09	TGTGTGTATCCATGGCCT	ATCTGCAATGACAATGGCAA	GT&G
0			C
RMS09	GATCAGGGTGAATACCGAGC	GCCACTCTCTCTGTCCCTCAA	GA&G
1			T
RMS09	TGAAATGAGAGACCAATTCCAA	ATCAAGTGAGCCGATGGAG	AT&G
2			T
RMS09	CGTTCTCGTTGTCATCG	CCCTCTCTCCAGTCACGA	GA
3			
RMS09	TCCTATCCACACCGACATCA	TCACAAATACCTCCACTCGC	GA
4			
RMS09	CCAATCTCCTCAACTCCCAG	TCAGGGCTTCTAAAGCTTGC	GA
5			
RMS09	TGACCAATATGACAGAGAACCA	TGATAGCCTTACATATGGAAACAT	AT&G
6			T&AT
RMS09	ATCTGGCTGAACACCACACA	CATGCTAACTCTCCATGTTCCA	GA&G
7			T
RMS09	CACGTCCCATTCCAGAATT	CCCTCAATGGAGAGCAAGAG	GT /
8			GA
RMS09	GGTCTGGTTCTTGAGGTGA	CTCTCTCGTCCGAAAGCATC	GA
9			
RMS10	AGAGCTCCGCTCTGGATATG	AAGCCAAAGCTTACGTGCAT	GT&A
0			T
RMS10	GAAGAGACTGAAAGCTTGAAGGA	CTCCTCTCCACTCCTCACCA	GA
1			
RMS10	AACTAAATGGTTGAGATGCCAA	GGAATTTCGTTCTTAAGCTAAGTT	GT
2			
RMS10	ATTATGCGAACCAAACGAGG	TGGCAGCATTCTCCCTAAAC	GT
3			
RMS10	CTAAAGCTTGAGCAAACAAATG	GGAGTATTGGCCGTAGGTGA	GA
4			
RMS10	TTGGTCTAATGCCCTATCCC	CCAGCCCTAGCCATAATTGA	GT&A
5			T

	44	
RMS10	CTCTCCCTCTGCATCAAA	CCTCTTCTCTGCAACCCAAG
6		GA
RMS10	CGACCTTGAACTCGATGGAT	CATGAAAGTGGAGCTAGCTAAGAA
7		AT&G T
RMS10	GATGCCATGGCATGTAAAG	TTCTCTAGTTCCGGCTGC
8		GA
RMS10	TGCAAACCTAAATTCCACAGAA	TGGCCTCTACAGCTCCTGTT
9		GT
RMS11	TATGAGAATGAGCGTGTGGG	TTCCCTCTCATTCCCTCTCCC
0		GT
RMS11	TTAGTCATCATCTTCAGTTATCAA	ATTCAATTGGCTTCACTGGG
1	GAA	GA
RMS11	CAAGGATACCAGTCGGAGAGA	AGAAATGGACAGCTCCGAAA
2		AT&G T
RMS11	CATGGATTGCGTGTCTTCTG	GGCATCAGAAAGCTGAAAGG
3		GA
RMS11	AGTCGCATAAACAGGACTGGG	TTGGGATTCGGATAAGTCG
4		GA
RMS11	CGTGAAGACGCAAAGTCAA	GGAGGAGAAGGAGGAGTTGTG
5		GA
RMS11	CACCCACTGGAATACTGGCT	CGACAAGCATGACCTGAAAT
6		AT&G T
RMS11	TCTTCTTCTCTCACCGCCAT	GGCCGATTGTTGACCTAGA
7		GA
RMS11	TGGCTATGGGAAGAACATGA	TCAGACAAATAATGCGTTACCAA
8		(AT& GT
RMS11	GCACGCACACATATATAACAACA	GATATCCGCAGCCAAGAAAG
9	A	AT&G T
RMS12	CAGTTGAAGAGAACCAAGGG	TGGTGGTAGGGAAATGAAA
0		GT
RMS12	TCCTCTCCAAGACACAAATATTCAA	GCCCTCTCTGCTCTCCCTAA
1		GT
RMS12	ATTCCACTTCCTCCTTCCCA	GGATTCTTCCTCCTGACCC
2		GA
RMS12	AAACACTCTAAGGAGGTATTCCC	CGAAGTCTCCATGGTTCT
3	TAA	GA
RMS12	TTTGTGGTCGTGTGTGTAT	AGGCACAAATACTATCCACCTG
4		GT
RMS12	AAGTGAAGACTGAGCGACCG	CTACTCCAATGTCCGCTTCC
5		GA
RMS12	AACGACCGCCTAGGAGAAA	TTGTTCTGTCGAATGGGT
6		GT
RMS12	TGCCTTCTAGATTGCTGGA	TAGTTGTTCGTCACCCACCC
7		GA
RMS12	AGCATCACGAGCACATTAG	GCGAAGATTACCCAATGAC
8		GA
RMS12	ACGTGCACACACTCACACAC	ACTGATGCAGTTGCTCTGA
9		GT
RMS13	CAAATCAATCTGCAAACCCA	TTTGCAGATACCAGATGCAG
0		GA
RMS13	CGGCCAGAGATAACAGATGG	TGTTTGTGCTTAACTACTACAACC
1	TT	GA
RMS13	TGTGGTTATGAATTGCTGGTG	TTCAGTTGGTTGAATGGGAG
2		GA
RMS13	TCTGCAACAATCAGCAGAAGA	ATTCTGGCAAATCCGAATG
		GA

3	RMS13	TGAGCTCAAGCAATATGCAA	GGCTGTCTCTGATTCCAGTATG	GA
4	RMS13	GACCGATTGGAGAGGAATGA	TTGCCTTCTCCCTCTGTT	GA
5	RMS13	GATCATGAGAGTCGCCAAA	AAGAGGCAGATATGGAGCGA	GA
6	RMS13	TGTACATGATGATGGGACGC	GGCAATTGCAAAGACAGTCA	GA
7	RMS13	CTTCTGAGAGGCCACACACCA	GCAAACACATCCCACATCATCA	GA&a ndere
8	RMS13	CAAGTATCTGCTCAGGCAAGC	CCATCACATTGGCTCTTCT	GA
9	RMS14	CCAATAGCGATGCAATGAGA	TTGGCTACCACTAACCTCCC	GT
0	RMS14	ACAGAGACTTGACGCTGCAT	AGCGTGTGTAGCTAGGGAGC	GT
1	RMS14	TGGCCTCAACGTCTTCTACC	CCTGAAATATCCCTATGTCAGAAA	2 x GA
2	RMS14	GTGGGAAGTGTGGAACAAAC	GCCTCATCCTGTCCATCTTC	GA
3	RMS14	TTTATCACTGTCACAAGGCATTA	GAGCTCCATGAGGTGTTCC	GT
4	RMS14	TGCTCACTTACCCAGAACGCC	TCTCTCTCATTTCAAGAGTAAACCC	2 x GA
5	RMS14	ACAAGGCATTCACCTGGTT	TTTCTGGCCTGCATAAATA	GT
6	RMS14	CCAATCTCAATAACACCGAGC	TCTTGCTGCTGCTAATGCTCA	AT&G T
7	RMS14	TTTAGCAGGCATTGGCACTAT	ACCTCCAGCACCAACTCCT	GT
8	RMS14	CGGTGTGTAGTTGATTGGA	TCAAATTCTGGCCTCTGTCC	AT&G T&AT
9	RMS15	TGCTGCAGTATGATGCCAAT	TGGAAATCCTTCCCTTCCTT	GT
0				

2. Testkit zur genetischen Analyse von Kultur- und Wildformen der Gattung Rosa umfassend ein oder mehrere Oligonukleotidpaare nach Anspruch 1.

3. Testkit nach Anspruch 2 umfassend mindestens ein Oligonukleotidpaar folgender Mikrosatellitenmarker: RMS001 RMS003 RMS008 RMS011 RMS015 RMS017 RMS024 RMS030 RMS034 RMS035 RMS039 RMS042 RMS043 RMS044 RMS045 RMS046 RMS050 RMS051 RMS054 RMS055 RMS060 RMS061 RMS071 RMS073 RMS078 RMS079 RMS080 RMS082 RMS086 RMS091 RMS094 RMS108 RMS110 RMS116 RMS117 RMS118 RMS122 RMS125 RMS126 RMS129 RMS132 RMS137 RMS147 RMS023 RMS027 RMS029 RMS037 RMS038 RMS047 RMS052 RMS057 RMS058 RMS059 RMS062 RMS063 RMS065 RMS066 RMS070 RMS072 RMS077 RMS084

RMS059 RMS062 RMS063 RMS065 RMS066 RMS070 RMS072 RMS077
RMS084 RMS088 RMS089 RMS090 RMS095 RMS097 RMS098 RMS102 RMS103
RMS104 RMS107 RMS112 RMS113 RMS115 RMS120 RMS128 RMS138 RMS139
RMS140 RMS143 RMS144 RMS145 RMS146 RMS148.

4. Testkit nach Anspruch 2 umfassend mindestens ein Oligonukleotidpaar folgender Mikrosatellitenmarker: RMS023 RMS027 RMS029 RMS037 RMS038 RMS047 RMS052 RMS057 RMS058 RMS059 RMS062 RMS063 RMS065 RMS066 RMS070 RMS072 RMS077 RMS084 RMS088 RMS089 RMS090 RMS095 RMS097 RMS098 RMS102 RMS103 RMS104 RMS107 RMS112 RMS113 RMS115 RMS120 RMS128 RMS138 RMS139 RMS140 RMS143 RMS144 RMS145 RMS146 RMS148
5. Testkit nach Anspruch 2 umfassend mindestens ein Oligonukleotidpaar aus folgendem Set: RMS023, RMS029, RMS038, RMS047, RMS052, RMS057, RMS059, RMS062, RMS065, RMS070, RMS077, RMS088, RMS089, RMS095, RMS097, RMS102, RMS103, RMS104, RMS112, RMS115, RMS120, RMS128, RMS139, RMS146 oder RMS148.
6. Testkit nach Anspruch 2 oder 3 umfassend folgende Oligonukleotidpaare: RMS023, RMS029, RMS038, RMS047, RMS052, RMS057, RMS059, RMS062, RMS065, RMS070, RMS077, RMS088, RMS089, RMS095, RMS097, RMS102, RMS103, RMS104, RMS112, RMS115, RMS120, RMS128, RMS139, RMS146 oder RMS148.
7. Verfahren zur Herstellung von Mikrosatellitenmarkern für Pflanzen der Gattung Rosa, dadurch gekennzeichnet, dass hypervariable Genomabschnitte (sogenannte Mikrosatelliten) mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) zu polymorphen Fragmenten in Gegenwart mindestens eines Oligonukleotidpaars gemäß Anspruch 1, das links und rechts für jeden Mikrosatelliten-Locus eine Mikrosatellitensequenz flankiert, amplifiziert, anschließend aufgetrennt und detektiert werden.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Auf trennung der Mikrosatellitenmarker ge elektrophoretisch, insbesondere durch hochauflösende Agarosegele, native Polyacrylamidgele, denaturierende Polyacrylamidgele oder massenspektrometrisch erfolgt.
9. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion je nach Trennungssystem über Ethidiumbromidfärbung, Silberfärbung, bei radioaktiver Markierung über Autoradiographie oder mittels automatischem Sequenziergerät unter Verwendung farbstoff- bzw. fluoreszenzmarkierter Primer oder massenspektrometrisch erfolgt.

10. Verwendung der Oligonukleotide nach Anspruch 1 zur genetischen Analyse von Kultur- und Wildformen der Gattung Rosa.
11. Verwendung nach dem Anspruch 10 zur genetischen Kartierung und Markierung von monogenen und polygenen Eigenschaften und deren Selektion, zur Verwandtschaftsanalyse und Sortenidentifikation sowie zur Evaluierung von Sortenreinheit, Hybrididentifikation und Pflanzenzüchtung.

1 / 4

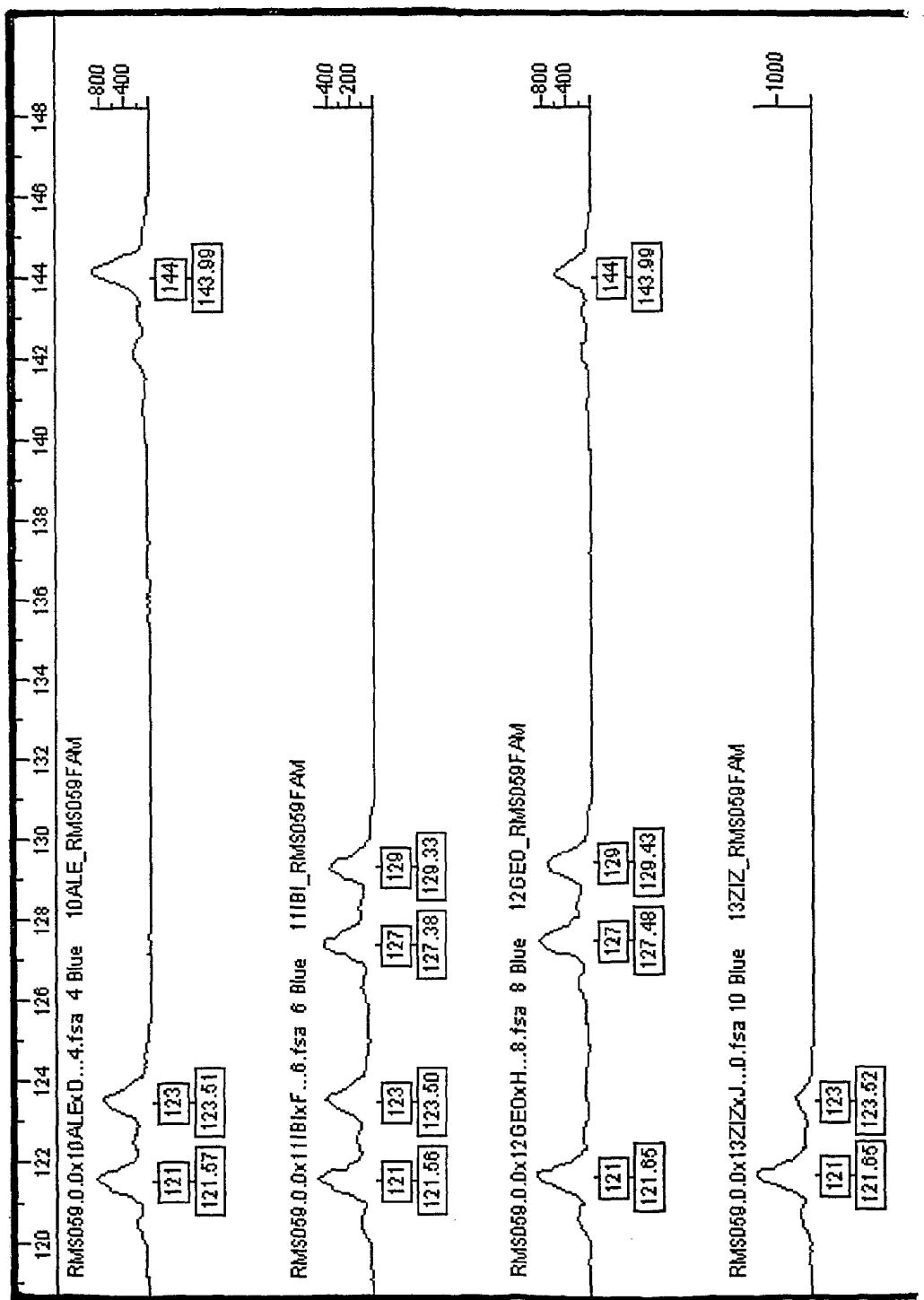


Abbildung 1a

2 / 4

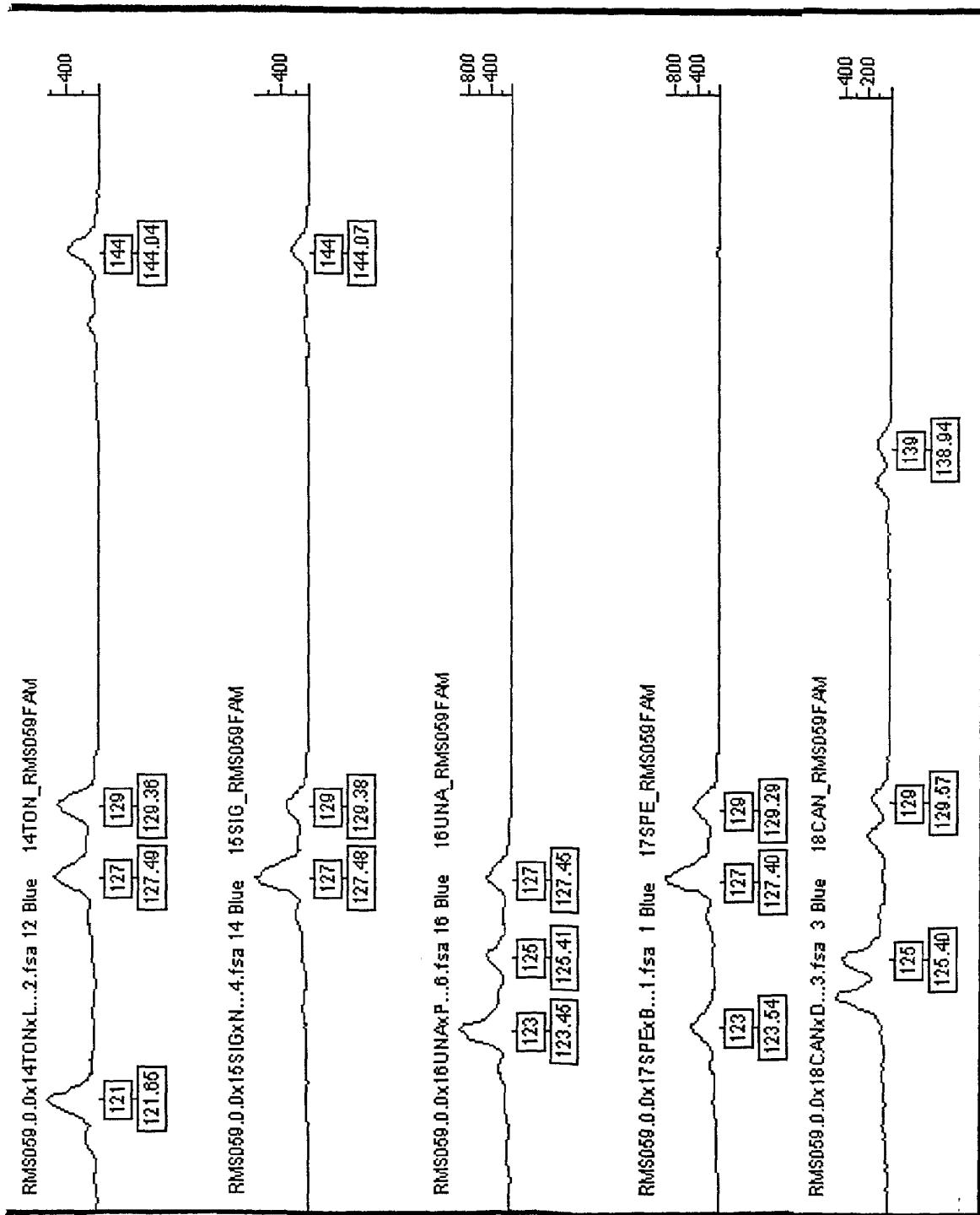


Abbildung 1b

Abbildung 2:

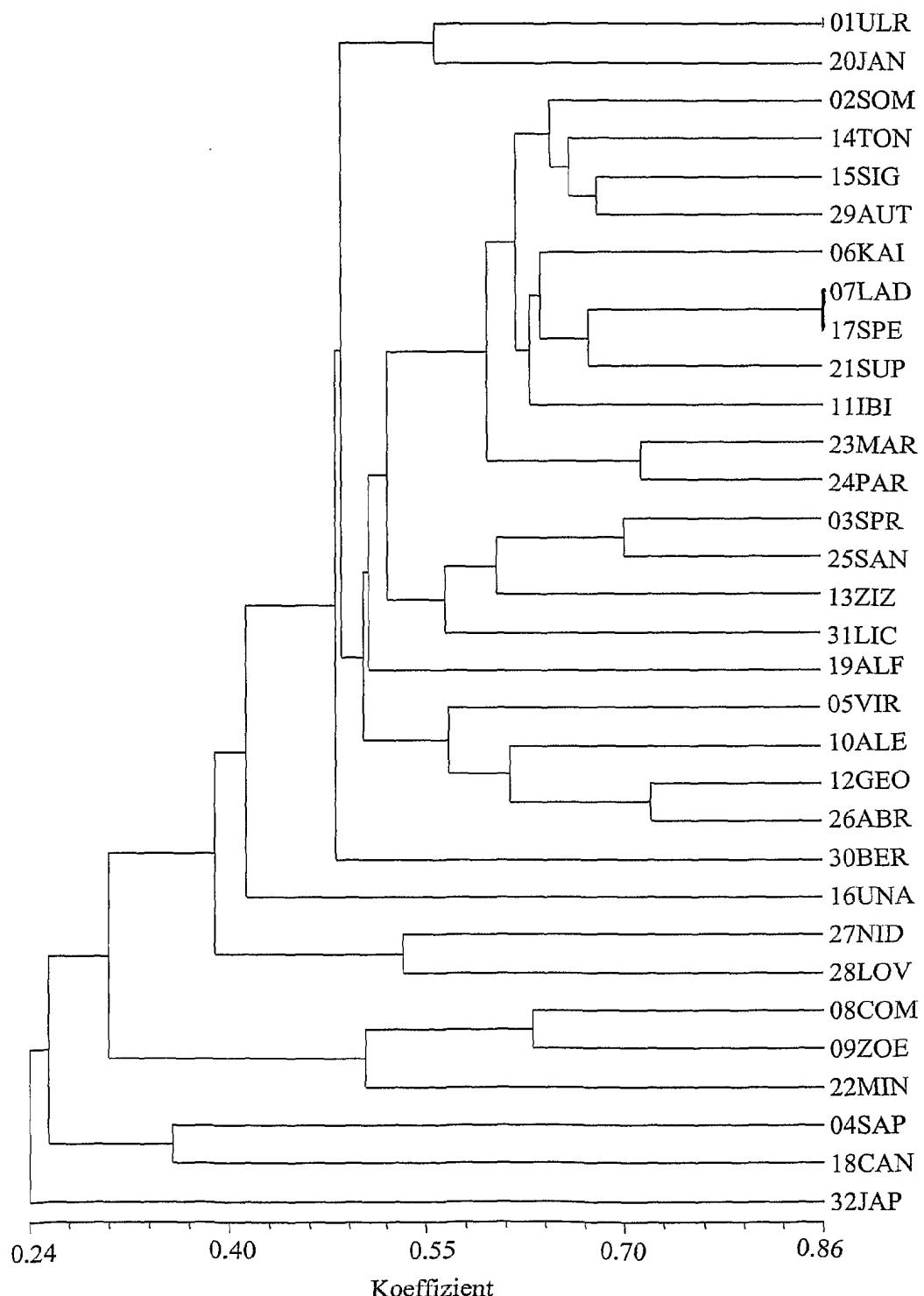


Abbildung 3:

